



**HAL**  
open science

# BIOThERAPIES et VOIE NASALE : développement et application dans la polypose nasosinusienne

Maxime Fieux

► **To cite this version:**

Maxime Fieux. BIOThERAPIES et VOIE NASALE : développement et application dans la polypose nasosinusienne. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Est Créteil, 2023. Français. NNT : . tel-04789047

**HAL Id: tel-04789047**

**<https://hal.science/tel-04789047v1>**

Submitted on 18 Nov 2024

**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.

## THÈSE

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

### **BIOThERAPIES et VOIE NASALE : développement et application dans la polypose nasosinusienne**

Présentée publiquement par

**Maxime FIEUX**

**le 08 septembre 2023**

devant le jury composé de :

Geoffrey Mortuaire	Professeur – Université de Lille	Rapporteur
Cécile Rumeau	Professeure – Université de Nancy	Rapporteur
Audrey Nosbaum	Professeure – Université Lyon 1	Examineur
Camille Taillé	Professeure – Université Paris - Diderot	Examineur
Gilles Devouassoux	Professeur – Université Lyon 1	Examineur
Stéphane Tringali	Professeur – Université Lyon 1	Invité
Emilie Béquignon	Docteur – Université Paris Est Créteil	Directeur de thèse
André Coste	Professeur – Université Paris Est Créteil	Directeur de thèse

**Institut Mondor de Recherche Biomédicale**  
Inserm UPEC UMR955 Equipe 13 - CNRS EMR 7000  
Faculté de santé, Créteil, France



INSTITUT MONDOR  
DE RECHERCHE  
BIOMÉDICALE



Instituts  
thématiques

**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



## Résumé en Français

**Contexte :** Certaines biothérapies ont récemment été suggérées comme une alternative thérapeutique de recours pour la polypose nasosinusienne (PNS). En France actuellement, deux biothérapies (dupilumab et mépolizumab) sont prescriptibles dans la PNS sévère non contrôlée par la corticothérapie orale et la chirurgie mais les termes « sévérité » et « contrôle » ne sont pas consensuels. La PNS, modèle de maladie inflammatoire de type 2, est également considérée comme un modèle de dysrégulation épithéliale dont la pathogénie n'est pas complètement élucidée. L'effet des biothérapies, à l'échelle cellulaire, sur les cellules épithéliales nasales humaines (CENH) n'a pas été exploré et d'autres cibles thérapeutiques pourraient être envisagées. De plus, la voie d'administration sous-cutanée pourrait être une limite à l'efficacité de ces biothérapies. L'administration par voie nasale est un nouveau défi à relever. Récemment, un récepteur (le récepteur néonatal au fragment cristallisable (FcRn) des Ig), jouant un rôle clef dans l'homéostasie des immunoglobulines (Ig), a été mis en évidence au niveau de l'épithélium nasal. Des biothérapies, hors du seul cadre de la PNS, pouvant être reconnues par le FcRn, existent déjà et sont actuellement administrées par voie intraveineuse. Dans le traitement de l'hémophilie B (HB), l'Eftrenonacog alfa (rFIX-Fc) est une biothérapie fusionnée au Fc qui pourrait être administrée par voie nasale.

**Objectif :** L'objectif de cette thèse était de : i/ créer un score composite (clinique, scanographique et biologique) *in silico* visant à déterminer la sévérité de cette maladie ; ii/ caractériser *in vitro* les effets de l'OSM, de l'IL-4, de l'IL-13 et du dupilumab (barrière, efficacité du battement ciliaire et réparation) sur les CENH ; et, iii/ évaluer *in vivo* l'efficacité d'une nouvelle voie d'administration nasale d'une biothérapie (le rFIX-Fc) sur des modèles murins.

**Méthodes :** Une étude nationale prospective multicentrique (étude PSI pour *Polyposis Severity Index*) a été mise en place en France (NCT05056714). Un modèle à variables latentes reliant les différents indicateurs mesurés chez les patients à la sévérité de la PNS a été construit pour générer des équations structurelles. Dans un modèle de cultures primaires de CENH en interface air-liquide, les effets des cytokines (IL-6, OSM, IL-4, et IL-13) et du dupilumab sur les fonctions épithéliales (barrière, efficacité du battement ciliaire et réparation) ont été comparés à des conditions contrôles. Enfin, un protocole expérimental a été mis en place pour faire la preuve du concept de l'administration nasale de rFIX-Fc et étudier le rôle du FcRn à l'aide de modèles murins transgéniques (knock-out (KO) pour le FcRn, KO pour le facteur IX, et humanisé pour le FcRn).

**Résultats :** A ce jour, 417 patients ont pu être inclus dans l'étude PSI et les premières modélisations statistiques seront réalisées dès n=470. *In vitro*, l'OSM, mais pas l'IL-6, a induit une diminution significative de la fonction de barrière et de l'efficacité du battement ciliaire dans les CENH. Après 24 heures, la vitesse de réparation épithéliale après blessure était significativement plus élevée dans les CENH stimulées par l'OSM. *In vitro*, l'IL-4, mais pas l'IL-13, a induit une diminution significative de la fonction de barrière, de l'efficacité du battement ciliaire et de la vitesse de réparation épithéliale après blessures dans les CENH. *In vitro*, le dupilumab n'a eu aucun effet négatif sur les CENH et a restauré toutes les fonctions épithéliales altérées par une exposition des CENH à l'IL-4. *In vivo*, après administration intranasale, le rFIX et rFIX-Fc ont été délivrés de manière équivalente dans le plasma, quelle que soit la souche de souris étudiée, par un mécanisme passif de transport indépendant du FcRn. L'activité du FIX était conservée après passage transmuqueux chez les souris KO pour le FIX.

**Conclusion :** Le modèle PSI devra nous permettre de mieux caractériser la sévérité de la PNS pour cibler les patients éligibles aux biothérapies. Ensuite, nous avons identifié une nouvelle potentielle cible thérapeutique : l'OSM qui induit *in vitro* un dérèglement de la fonction de barrière épithéliale. Le dupilumab est capable, *in vitro*, de restaurer l'ensemble des fonctions épithéliales testées (barrière, clairance mucociliaire et réparation épithéliale) et altérées par l'IL-4, améliorant notre compréhension de son efficacité *in vivo*. Enfin, nous avons démontré un passage sanguin du FIX avec conservation de son activité chez la souris, rendant possible le développement de cette voie d'administration chez l'homme pour le traitement de l'HB et pour d'autres biothérapies comme le dupilumab.



## Résumé en Anglais

**Background:** Multiple biologics have been recently suggested as a new treatment for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). Currently, only two drugs can be prescribed in France (dupilumab and mepolizumab), as a second line treatment, in severe and not controlled CRSwNP despite oral corticosteroids and sinus surgery, but the terms "severity" and "control" are not consensual. CRSwNP is a type 2 inflammatory model? disease? and is also considered an epithelial dysregulation model, for which the pathogenesis is not completely elucidated. The effect of biologics, at the cellular level, on human nasal epithelial cells (HNEC) has not been explored and other therapeutic targets could be considered. In addition, the subcutaneous route might be a limitation to the efficacy of these drugs. Here, we focus on an ubiquitous receptor, the neonatal receptor for the crystallizable fragment (FcRn) of Ig, which plays a key role in immunoglobulin (Ig) homeostasis. Fc-fused biologics ((Eftrenonacog alfa, rFIX-Fc) exist for the treatment of hemophilia B (HB). This disease requires frequent intravenous administration of factor IX (FIX) to prevent bleeding. The rFIX-Fc could be recognized by the FcRn allowing intranasal delivery (IND).

**Objective:** The objective of this thesis was to : i/ set up a national clinical study (Polyposis Severity Index, PSI study) to create a severity score for CRSwNP *in silico* based on clinical, biological and radiological data; ii/ characterize *in vitro* the effects of OSM, IL-4, IL-13 and dupilumab on HNEC (barrier function, ciliary beating efficiency and wound repair rate); and, iii/ evaluate *in vivo* the efficacy of IND for biologics (rFIX-Fc), used in the treatment of HB in transgenic mouse models.

**Methods:** A prospective multicenter study was set up in France (NCT05056714). In order to build the latent variable model linking the different indicators measured in patients to the latent severity of CRSwNP (PSI score), structural equations will be generated. In a primary culture model of HNEC in air-liquid interface, the effects of cytokines (IL-6, OSM, IL-4, and IL-13) and dupilumab on epithelial functions (barrier function, ciliary beating efficiency and wound repair rate) were compared to control conditions. Finally, an experimental research protocol on animals was set up to make the proof-of-concept that IND of rFIX-Fc is possible and to study the role of FcRn on transgenic mice models (FcRn knock-out (KO), FIX KO, and FcRn humanized).

**Results:** To date, 417 patients have been included in the PSI study and we hope to quickly start the first statistical modelling (as soon as n=470). *In vitro*, OSM, but not IL-6, induced a significant decrease in barrier function and mucociliary clearance efficiency on HNEC. After 24 hours, the wound repair rate (WRR) was significantly higher in OSM-stimulated HNEC. *In vitro*, IL-4, but not IL-13, induced a significant decrease in barrier function, mucociliary clearance efficiency, and WRR on HNEC. *In vitro*, dupilumab had no direct effect on HNEC and restored all epithelial functions primarily impaired by IL-4 exposure. *In vivo*, after IND, both rFIX and rFIX-Fc were equally delivered to the blood compartment, irrespective of the mouse strain studied, through a passive mechanism of transportation across the mucosal barrier, independent of FcRn receptor. FIX activity levels were increased following IND in FIX KO mice.

**Conclusion:** The PSI model should allow us to better characterize the severity of CRSwNP to target patients eligible for biologics. Then, we have shown that *in vitro*, OSM, dysregulates the epithelial barrier function through excessive epithelial WRR and the loss of ciliary function, leading to a chronic inflammatory state that can evolve towards fibrosis. Thus, becoming a new potential therapeutic target. Next, dupilumab was able, *in vitro*, to restore all tested epithelial functions (barrier, ciliary and wound repair) and altered by IL-4 exposure, improving our understanding of its efficacy *in vivo*. Finally, we have demonstrated that FIX passes through the bloodstream and its efficacy is preserved in mice, making it possible to develop this route of administration in humans for the treatment of HB and probably other biotherapies such as dupilumab.



## **Résumé vulgarisé pour le grand public**

La polyposse nasosinusienne (PNS) est une maladie inflammatoire chronique de la muqueuse du nez secondaire à la présence de facteurs inflammatoires appelés cytokines. De nouveaux médicaments existent (dupilumab et mépolizumab), réservés aux patients avec une forme sévère de la maladie, mais le terme « sévérité » n'est pas consensuel. Ces médicaments dirigés contre les cytokines à l'origine de la PNS sont délivrés en injections sous-cutanées ce qui pourrait être une limite à leur efficacité. Ainsi, développer de nouvelles voies d'administration non invasives, comme la voie nasale, pourrait être intéressant. Les objectifs de cette thèse étaient : de mener une étude clinique en France pour mieux définir la sévérité de la PNS ; d'étudier l'effet des cytokines et du dupilumab à l'échelle cellulaire ; et, d'évaluer l'efficacité de la voie nasale pour l'administration de médicaments similaires. Ce travail nous a permis de découvrir une nouvelle cytokine cible, l'oncostatine M, de démontrer que le dupilumab restaurait les fonctions cellulaires altérées par les cytokines, et de prouver que la voie nasale était potentiellement efficace pour ces nouveaux médicaments.



## Mots-clefs

Administration nasale  
Anticorps monoclonal  
Biothérapies  
Biomarqueurs  
Clairance mucociliaire  
Culture primaire  
Cellules épithéliales  
Dupilumab  
Épithélium nasal  
Equations structurelles  
Fonction de barrière  
Facteur IX  
Hémophilie B  
IL-6  
IL-4  
IL-13  
*In vivo*  
*In vitro*  
*In silico*  
Jonctions serrées  
Muqueuse nasale  
Oncostatine M  
Polypose nasosinusienne  
Protéines de fusion au Fc  
Résistance électrique transépithéliale  
Réparation épithéliale  
Récepteur néonatal au fragment cristallisable (FcRn)  
Récepteurs Fc  
Rhinosinusite chronique avec polypes  
Souris  
Score de sévérité  
Systèmes d'administration de médicaments  
Transport biologique  
Variables latentes  
Voie d'administration



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le Professeur Cécile Rumeau et Monsieur le Professeur Geoffrey Mortuaire, deux modèles professionnels de réussite hospitalo-universitaires, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier Messieurs les Professeurs Camille Taillé, Audrey Nosbaum, et Gilles Devouassoux qui ont accepté de participer au jury et de venir jusqu'à Créteil pour ma soutenance.

A mes directeurs de thèse, à Monsieur le Professeur André Coste

Je vous remercie d'avoir accepté que je m'inscrive en thèse au sein de votre équipe quand je suis venu vous voir au congrès de la SFORL, en octobre 2019, alors que j'étais interne en 10<sup>ème</sup> semestre à Lyon. Cette thèse est l'occasion de vous remercier pour votre dévouement auprès des internes d'ORL de France. Votre encadrement dépasse le contexte de la recherche fondamentale, vous avez été un mentor bienveillant pendant 4 ans.

A Madame le Docteur Emilie Béquignon

Il n'y a probablement pas assez de lignes sur cette page et de pages dans cette thèse pour que je puisse exprimer tout ce que vous m'avez enseigné et appris depuis mon premier jour à l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale. Quand vous avez accepté de co-diriger cette thèse, j'ai su que je serai encadré, soutenu et que votre perfectionnisme et votre réactivité seraient salvateurs. Merci pour toutes ces heures de travail que vous m'avez accordées.

A mon chef de service, à Monsieur le Professeur Stéphane Tringali

Vous m'avez fait un grand honneur il y a 7 ans en me proposant d'embrasser une carrière hospitalo-universitaire. Vous êtes mon guide spirituel et j'espère être à la hauteur. Merci de me donner les moyens au quotidien pour en faire plus, toujours plus. J'attends la suite avec impatience.

A mon chef d'équipe au laboratoire, à M. Bruno Louis,

Merci Bruno, tu es un scientifique de très haut vol, d'une modestie et d'un respect immenses, d'une bienveillance sans limite alors que tu nous regardes évoluer et grandir au sein de ton équipe. Si quelqu'un a eu un impact sur moi pendant ces 3 années au laboratoire et surtout cette année à temps plein c'est toi. Toujours précis, toujours disponible, toujours compréhensif, jamais dans le jugement et surtout toujours présent. Tu es un modèle d'écoute, de patience et de calme. J'aspire un jour à me rapprocher de toutes ces compétences que tu possèdes, vraiment merci beaucoup pour tout ce que tu m'as appris et je sais que nous allons continuer à collaborer entre R, Python, Matlab, algorithmes et rhinomanométries.

Merci à l'ensemble des chercheurs, collaborateurs, méthodologistes, traducteurs, relecteurs, co-doctorants, médecins, techniciens, et assistants administratifs qui m'ont permis de mener ce travail à bien qu'ils habitent à Paris (Bruno, Marcel, Daniel, Sophie, Virginie, Vianney, Yvan) ; Lyon et travaillent aux Hospices Civils de Lyon (Fabien Subtil, Mikail, Caroline, Véréna) ou au Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (Sandra, Claire, Bernard, Renaud, Céline, Evelyne, Cynthia, Fanny et Altan) ; ou Poitiers (Florent, Laure, Jean Claude, Xavier, Matthieu).

Je tiens à remercier, ma famille, mes amis et l'amour de ma vie, Camille Brenac, pour leur soutien sans faille.



## Liste des abréviations

ANSM	Agence nationale de sécurité des médicaments et produits de santé
ACT	<i>Asthma control test</i>
Ac	Anticorps
AcM	Anticorps monoclonal
AERD	<i>Aspirin-exacerbated respiratory disease</i>
AFC	Analyse factorielle confirmatoire
a.a.	Acides aminés
AINS	Anti inflammatoires non stéroïdiens
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMT	<i>Appropriate medical treatment</i>
AT	Antithrombine
ATAD	<i>Acetylsalicylic acid treatment after desensitization</i>
ATP	Adénosine triphosphate
AP	<i>Activation peptid</i>
ARNm	ARN messenger
AUC	<i>Area under the curve</i>
ARS	<i>Acute rhinosinusitis</i>
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
β2m	Beta 2 microglobuline
CECCAP	Comité d'éthique en expérimentation animale
CPP	Comité de protection des personnes
CBCT	<i>Cone beam computed tomography</i>
CBF	<i>Ciliary beat frequency</i>
CCF	Chirurgie cervico-faciale
CCR3	motif C-C du récepteur 3 de la chimiokine
CCL	CC chimiokine ligand
CD	Cluster de différenciation
CFORL	Collège français d'ORL
CNIL	Commission nationale de l'informatique et des libertés
CRF	<i>Case report form</i>
CENH	Cellules épithéliales nasales humaines
CL-4	Claudine 4
CLI	Cellules lymphoïdes de l'immunité
CK	Cytokératine
CHIC	Centre hospitalier intercommunal de Créteil
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CMC	Clairance mucociliaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CML	Cellules musculaires lisses
CSO	Cortisone orale (corticothérapie par voie orale)
CSI	Cortisone inhalé (spray nasal de corticoïdes)
CXCL-8	<i>CXC motif chemokine ligand 8</i>
CRP	<i>C reactiv protein</i>
CRSwNP	<i>Chronic rhinosinusitis with nasal polyps</i>

CRSSNP	<i>Chronic rhinosinusitis sin nasal polyps</i>
CTExt	Complexe ténase extrinsèque
CTInt	Complexe ténase intrinsèque
CPThr	Complexe prothrombinase
Cx	Connexine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEP	Débit expiratoire de pointe
DO	Densité optique
ECR	Essai clinique randomisé
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>Eosinophil derived neurotoxin</i>
ECX	<i>Eosinophil peroxidase</i>
EO	Eosinophiles
EIG	Effet indésirable grave
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EHL	<i>Extended half-life</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunoabsorbent assay</i>
EMA	<i>European medicines agency</i>
EPO	Eythropoïétine
EPOS	<i>European position paper on rhinosinusitis</i>
ERS	<i>European rhinologic society</i>
(F)ESS	<i>(Functionnal) Endoscopic sinus surgery</i>
EVOM	<i>Endothelial volt ohm meter</i>
EVA	Echelle visuelle analogique
FAH	Facteurs antihémophiliques
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FV-VIII-IX	Facteur V, Facteur VIII, Facteur IX
FIX:C	Activité du FIX après dosage chromogénique
FIX:Ag	Concentration plasmatique du FIX après ELISA
FBC	Fréquence du battement ciliaire
Fc	Fragment cristallisable des immunoglobulines
FcRn	Récepteur néonatal pour le Fc des immunoglobulines
FFT	Transformée rapide de Fourier
FSH	Hormone follicostimulante
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor</i>
GEPA	Granulomatose éosinophilique avec polyangéite
HAS	Haute autorité de santé
HEK	Lignées cellulaires issue de rein embryonnaire humain
HCL	Hospices civils de Lyon
HB	Hémophilie B
HRP	<i>Horse radish peroxydase</i>
hFcRn	Humanisée pour le FcRn (souche murine)
IAL	Interface air-liquide
ICAM-1	<i>Inter cellular adhesion molecule-1</i>
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukines

IL-(4)R	Interleukine récepteur (IL-4 ou autres)
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
IHC	Immunohistochimie
IJMS	<i>International journal of molecular sciences</i>
IFN	Interféron
IN	Intranasale
INCS	<i>Intranasal corticosteroid</i>
IV	Intraveineux
JACI	<i>Journal of allergy and clinical Immunology</i>
J	Jours
JAK	Janus Kinase
JC	Jonctions communicantes
JTH	<i>Journal of thrombosis and haemostasis</i>
JS	Jonctions serrées
KO	<i>Knock-out</i>
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
LT4H	<i>Leukotriene A4 hydrolase</i>
LNK	Lymphocyte <i>natural killer</i>
LOOM	Longueur d'onde de l'onde métachrone
LBTI	Laboratoire de biologie tissulaire et ingénierie thérapeutique
LITEC	Laboratoire inflammation, tissus épithéliaux et cytokines
LIFR	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>
LT2	Lymphocyte de type 2
LTreg	Lymphocytes T régulateurs
M	Mois
M1, M2	Macrophage de type 1 ou de type 2
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>Major basic protein</i>
MEC	Matrice extra-cellulaire
MMP	Métalloprotéinases matricielles
MUC	Mucines
N-ERD	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exacerbated respiratory disease</i>
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>
(N-)PGP	(N-acétyl) Proline-Glycine-Proline
NO	<i>Nitric oxyde</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
OHAT	<i>Oral health assessment tool</i>
OSM	Oncostatine M
ORL	Otorhinolaryngologie
OeO	Oesophagite à éosinophiles
O <sub>2</sub>	Oxygène
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PK	Pharmacocinétique
PD	Pharmacodynamique
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PBES	Plateau de biologie expérimentale de la souris

PGD2	Prostaglandine D2
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PNS	Polypose nasosinusienne
PSI	<i>Polyposis Severity Index</i>
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RA	Rhinite Allergique
RT	<i>Room Temperature</i>
rFIX	Facteur IX recombinant
rFIX-Fc	Facteur IX recombinant +/- associé au Fc
RGO	Reflux gastro-oesophagien
RCT	<i>Randomized controlled trial</i>
RANKL	<i>Receptor activator of the NFκB ligand.</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RETE	Résistance électrique transépithéliale
RSC	Rhinosinusite chronique
S	Semaines
SAA	<i>Serum amyloid A</i>
SC	Sous-cutanée
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SAS	Syndrome d'apnée du sommeil
SHE	Syndrome hyperéosinophilique
SFORL	Société française d'ORL et de chirurgie cervico-faciale (CCF)
SHL	<i>Standard half life</i>
SNOT-22	<i>22-item sino-nasal outcome test</i>
SNC	Système nerveux central
SP	Domaine de la chaîne lourde du FIX
SMR	Service medical rendu
T2	Inflammation de type 2
TDM	Tomodensitométrie
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TSLP	Lymphopoïétine stromale thymique
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
USA	<i>United States of America</i>
UE	Union européenne
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vWF	Facteur de von Willebrand
VL	Variables latentes
VLA	<i>Very late antigen</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VMHV	Vidéomicroscopie à haute vitesse
ZO-1	Zonula occludens 1

# Liste des Figures

## Axe 1

<b>Figure 1.</b> Exemple d'un modèle à équation structurelle appliquée à l'impact de la BPCO .....	32
<b>Figure 2.</b> Indications de prescriptions de biothérapies dans la PNS selon l'EPOS .....	33
<b>Figure 3.</b> Score de polypes nasaux endoscopiques .....	42
<b>Figure 4.</b> Score scanographique de Lund-MacKay.....	42
<b>Figure 5.</b> Echelle visuelle analogique .....	44
<b>Figure 6.</b> Modèle à équations structurelles pour l'estimation de la sévérité de la PNS (modèle PSI) .....	46

## Axe 2

<b>Figure 7.</b> Schéma des différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la PNS .....	55
<b>Figure 8.</b> Profil d'expression de la périostine dans l'épithélium nasal .....	57
<b>Figure 9.</b> Représentation schématique du sens de la clairance mucociliaire.....	59
<b>Figure 10.</b> Représentation schématique de la séquence de formation des polypes .....	61
<b>Figure 11.</b> IHC représentative de la Connexine 26 dans la muqueuse sinusienne .....	62
<b>Figure 12.</b> Liste des différentes fonctions effectrices de l'éosinophile (EO).....	64
<b>Figure 13.</b> Expression de VCAM et ICAM selon le phénotype .....	65
<b>Figure 14.</b> Destin des Lymphocytes T et cytokines associées.....	66
<b>Figure 15.</b> Fréquences des cellules Ig+ dans les tissus sinusiens .....	69
<b>Figure 16.</b> Classification des cellules de l'immunité innée (CLI) .....	71
<b>Figure 17.</b> Rôle des mastocytes dans la polyposse nasosinusienne (PNS).....	72
<b>Figure 18.</b> Voie de signalisation du TSLP via la TSLPR (IL-7R $\alpha$ + TSLPR).....	77
<b>Figure 19.</b> Effets du TSLP sur l'épithélium nasal .....	78
<b>Figure 20.</b> Niveau d'expression d'IL-25 et d'IL-33 dans les polypes de patients atteints de PNS .....	79
<b>Figure 21.</b> Fonctions de l'IL-6 et implications pathologiques.....	82
<b>Figure 22.</b> Modèle de l'OSM dans les dysfonctions épithéliales conduisant à la PNS .....	84
<b>Figure 23.</b> Effets de l'IFN $\gamma$ sur la différenciation mucociliaire.....	86
<b>Figure 24.</b> Effets de l'IL-4 et de l'IL-13 sur la FBC et la RETE.....	88
<b>Figure 25.</b> Effets de l'IL-13 sur la différenciation mucociliaire et la FBC .....	89
<b>Figure 26.</b> Voies de signalisation du complexe IL-5/IL-5R et effets sur l'épithélium .....	91
<b>Figure 27.</b> Représentation schématique des fonctions de l'IL-9 .....	93
<b>Figure 28.</b> Synthèse des différents types d'anticorps thérapeutiques .....	95
<b>Figure 29.</b> Algorithme de prise en charge selon l'EPOS .....	96
<b>Figure 30.</b> Représentation schématique des cytokines impliquées dans la PNS et de leurs anticorps spécifiques...	97
<b>Figure 31.</b> Représentation schématique des effets du dupilumab.....	98
<b>Figure 32.</b> Schéma des cibles du mepolizumab, du benralizumab et du reslizumab.....	99
<b>Figure 33.</b> Représentation schématique de l'effet de l'omalizumab sur les mastocytes et basophiles.....	100
<b>Figure 34.</b> Recherches scientifiques à mener en priorité dans la sinusite aiguë et chronique.....	104
<b>Figure 35.</b> Protéines impliquées dans la fonction de barrière de l'épithélium respiratoire .....	107
<b>Figure 36.</b> Modèle de culture primaire de CENH à l'interface air-liquide .....	109
<b>Figure 37.</b> EVOM3 avec son électrode STX2-PLUS de chez World Precision Instruments .....	111
<b>Figure 38.</b> Représentation schématique de l'épithélium nasal et sa couche de mucus .....	113
<b>Figure 39.</b> Principe de la densité relative de cils .....	114
<b>Figure 40.</b> Principe de la mesure de la longueur de l'onde métachrone .....	115
<b>Figure 41.</b> Equation de mesure de l'index d'efficacité du battement ciliaire (Stream 2D).....	117
<b>Figure 42.</b> Comparaison des différents paramètres d'analyse quantitative du battement ciliaire .....	118
<b>Figure 43.</b> Représentation du modèle de blessure .....	119

### Axe 3

<b>Figure 44.</b> Structure du FcRn de rat (structure de type CMH-1).....	171
<b>Figure 45.</b> Représentation schématique de la protection des IgG par le FcRn via une endocytose .....	171
<b>Figure 46.</b> Représentation schématique de la transcytose d'Ig grâce au FcRn .....	172
<b>Figure 47.</b> Rôle du FcRn au niveau de l'épithélium nasal .....	172
<b>Figure 48.</b> Transcytose inversée au niveau de la barrière hémato-encéphalique .....	173
<b>Figure 49.</b> Représentation schématique d'une souris transgénique pour le FcRn avec le schéma d'administration des biothérapies et des prélèvements sanguins réalisées.....	174
<b>Figure 50.</b> Synthèse du FcRn, de ses sites de liaisons, et de son activité pH dépendante .....	176
<b>Figure 51.</b> Représentation schématique de l'hémostase primaire, secondaire et de la fibrinolyse .....	178
<b>Figure 52.</b> Représentation schématique d'une plaquette et de ses principaux constituants.....	179
<b>Figure 53.</b> Représentation schématique du processus de la coagulation.....	180
<b>Figure 54.</b> Structure primaire du Facteur IX (FIX).....	181
<b>Figure 55.</b> Structure du complexe ténase intrinsèque et évolution du taux de thrombine chez un patient sain et hémophile B.....	182
<b>Figure 56.</b> Représentation schématique du Nonacog alfa (rFIX).....	186
<b>Figure 57.</b> Représentation schématique de l'Albutrepenonacog alfa (rFIX-Alb) .....	187
<b>Figure 58.</b> Evolution de l'activité du rFIX et du rFIX-Fc au cours du temps .....	189
<b>Figure 59.</b> Représentation schématique de l'Eftrenonacog alfa (rFIX-Fc).....	191
<b>Figure 60.</b> Schéma de l'épithélium nasal et voies de passages des molécules thérapeutiques .....	192
<b>Figure 61.</b> Synthèse des différents groupes et molécules thérapeutiques évalués.....	196
<b>Figure 62.</b> Analyse pharmacocinétique après administration par voie intraveineuse.....	197
<b>Figure 63.</b> Photo des souris maintenues anesthésiées grâce à des masques faciaux .....	198
<b>Figure 64.</b> Mise au point de l'administration nasale.....	198
<b>Figure 65.</b> Analyse pharmacocinétique après administration par voie intranasale : mise au point .....	199
<b>Figure 66.</b> Courbe de densité optique permettant d'estimer la concentration plasmatique en FIX.....	200
<b>Figure 67.</b> Représentation schématique de la méthode chromogénique .....	201

## Liste des Tableaux

### Axe 1

<b>Tableau 1.</b> Synthèse de la syntaxe lavaan pour définir le modèle .....	35
<b>Tableau 2.</b> Noms et adresses des centres participants à l'étude Polyposis Severity Index.....	40
<b>Tableau 3.</b> Données recueillies lors de la première et deuxième visite dans l'étude PSI .....	43

### Axe 2

<b>Tableau 4.</b> Synthèse des fonctions des cellules impliquées dans l'inflammation T2 .....	75
<b>Tableau 5.</b> Synthèse des fonctions des cytokines impliquées dans l'inflammation T2.....	94
<b>Tableau 6.</b> Synthèse des différentes biothérapies existantes ou en cours d'études dans la PNS .....	102

### Axe 3

<b>Tableau 7.</b> Effets des stratégies thérapeutiques impliquant le FcRn testées sur modèles murins.....	176
<b>Tableau 8.</b> Synthèse des facteurs de la coagulation et leurs principales caractéristiques .....	179
<b>Tableau 9.</b> Taux de FIX :C selon la sévérité de l'hémophilie et conséquences cliniques .....	183
<b>Tableau 10.</b> Posologie et fréquence des administrations par palier.....	184
<b>Tableau 11.</b> Objectifs cibles en FIX :C en fonction du niveau de risque hémorragique .....	184
<b>Tableau 12.</b> Caractéristiques structurales et AMM des molécules thérapeutiques de FIX.....	188

# Table des Matières

Résumé en Français.....	3
Résumé en Anglais.....	5
Résumé vulgarisé pour le grand public .....	7
Mots-clefs .....	9
Remerciements.....	11
Liste des abréviations .....	13
Liste des Figures .....	17
Liste des Tableaux.....	18
Table des Matières .....	19
Introduction.....	21
1. Introduction.....	23
2. Projet de thèse.....	26
Axe 1 :	
Développement d'un score de sévérité de la PNS pour guider les indications de biothérapies.....	29
1. Introduction.....	31
2. Rappels : Modèles à équations structurelles.....	33
2.1. Indications des biothérapies dans la PNS.....	33
2.2. Les propriétés métrologiques d'un score .....	34
2.3. Le package lavaan.....	34
3. Problématique .....	38
4. Méthodes pour l'étude <i>Polyposis Severity Index</i> (PSI).....	39
4.1. Méthodologie de la recherche .....	39
4.2. Population étudiée .....	40
4.3. Gestion des données .....	43
4.4. Taille de la population étudiée et aspects statistiques .....	45
5. Accord du comité scientifique et éthique .....	48
6. Synthèse et perspectives.....	49
Axe 2 :	
Caractérisation <i>in vitro</i> de l'effet des cytokines et d'une biothérapie sur l'épithélium nasal humain ...	51
1. Introduction.....	53
2. Rappels : Inflammation T2 et Biothérapies .....	54
2.1. Inflammation de type 2 : cellules et cytokines .....	54
2.2. Biothérapies de l'inflammation T2 .....	95
3. Problématique .....	106
4. Méthodes pour l'étude des fonctions épithéliales.....	107
4.1. Le modèle de cultures primaires de CENH .....	107
4.2. La fonction de barrière épithéliale .....	110
4.3. L'efficacité du battement ciliaire .....	113
4.4. La réparation tissulaire .....	119
5. Accord du comité scientifique et éthique .....	120
6. Article IL-6 & OSM.....	122
Résumé Français de l'article .....	122
7. Article IL-4, IL-13 & Dupilumab.....	141
Résumé Français de l'article .....	141

8. Synthèse et Discussion .....	164
Axe 3 :	
Evaluation <i>in vivo</i> de l'efficacité de l'administration nasale d'une biothérapie utilisée dans le traitement de l'Hémophilie B .....	167
1. Introduction.....	168
2. Rappels : FcRn, Hémostase et Hémophilie B.....	171
2.1. Le récepteur néonatal au fragment Fc des Ig (FcRn) .....	171
2.2. L'hémophilie .....	177
2.3. Prise en charge de l'hémophilie .....	183
3. Problématique .....	190
4. Méthodes pour l'administration nasale de Facteur IX .....	191
4.1. Introduction .....	191
4.2. Voies de passages nasales de molécules thérapeutiques .....	192
4.3. Modèles murins .....	193
4.4. Nombre d'animaux nécessaires .....	195
4.5. Efficacité du passage transmuqueux .....	198
5. Accord du comité scientifique et éthique .....	202
6. Revue systématique sur le FcRn et l'administration nasale des biothérapies .....	203
Résumé Français de l'article .....	203
7. Brief Report rFIX par voie IN.....	224
Résumé Français de l'article .....	224
8. Synthèse et Discussion .....	240
Synthèse .....	243
Conclusion et perspectives .....	247
Bibliographie.....	251
Annexes.....	285

# Introduction



# 1. Introduction

La polypose nasosinusienne (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. Outre l'infiltration granulocytaire et lymphocytaire du stroma inhérente à la réaction inflammatoire (P. Gevaert *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 (MEC) (œdème, fibrose) (Berger *et al.* 2002; Couto *et al.* 2008; Soler *et al.* 2009; Mortuaire *et al.* 2015). La rhinosinusite chronique (RSC) est divisée en RSC sans polype ou « *Chronic rhinosinusitis sin nasal polyps* (CRSsNP) » et RSC avec polypes « *CRS with nasal polyps* (CRSwNP) » selon le seul aspect de l'endoscopie nasale. La PNS s'intègre dans les CRSwNP, et elle peut ainsi être qualifiée de « primitive » par opposition aux PNS qui peuvent être observées secondairement (*e.g.* mucoviscidose, immunodéficience congénitale ou acquise, ou maladie de système). L'objet de cette thèse et des travaux qui la constituent est la PNS primitive de l'adulte, que nous nommerons plus simplement PNS dans la suite du manuscrit. D'après l'*European Position Paper on Sinusitis* (EPOS), la PNS est une pathologie chronique rhinosinusienne définie par une évolutivité depuis plus de 12 semaines (12S) caractérisée par la présence bilatérale et multifocale de polypes (W. J. Fokkens *et al.* 2020). Sa prévalence est de 4% aux Etats-Unis et varie de 2 à 4% en Europe (Hedman *et al.* 1999; Klossek *et al.* 2005). La PNS est retrouvée au sein d'un groupe hétérogène de patients qui diffèrent par la coexistence de comorbidités dont l'asthme, les allergies respiratoires, les pathologies respiratoires non allergiques exacerbées par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (*Non allergic exacerbated respiratory disease, N-ERD*), l'intoxication tabagique, l'âge d'apparition et la sévérité de la maladie (Kowalski *et al.* 2019; Philpott *et al.* 2018). Les principaux symptômes sont les troubles de l'odorat, l'obstruction nasale, les douleurs sinusiennes et la rhinorrhée. L'impact fonctionnel de la PNS est majeur et peut altérer la qualité de vie des patients (Sahlstrand-Johnson *et al.* 2011). Le traitement médical actuel comprend des irrigations nasales au sérum salé et des glucocorticoïdes par voie locale ainsi que des cures courtes de glucocorticoïdes par voie orale (bénéfice à court terme *versus* (*vs.*) placebo) (W. J. Fokkens *et al.* 2020). La chirurgie permet d'améliorer l'efficacité des traitements locaux en cas de corticodépendance, mais près de 40% des patients présentent une récurrence des polypes à 18 mois et 20% des patients nécessitent une reprise chirurgicale à 5 ans (Claire Hopkins *et al.* 2009). Les biothérapies, ciblant directement la cascade de l'inflammation de type 2 (T2), ont récemment été suggérées comme une alternative thérapeutique de recours pour la PNS alors qu'elles existaient dans l'asthme depuis 2005 et l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de l'omalizumab (Belliveau 2005; Luskin *et al.* 2005). Les récentes études de phase III concernant certaines biothérapies les positionnent comme une avancée thérapeutique majeure pour les patients avec PNS. Plusieurs biothérapies ont fait la preuve de leur efficacité dans la PNS, chacune ayant une cible précise, l'omalizumab (anti-IgE), le mepolizumab (anti-interleukine (IL)-5), le benralizumab (anti-sous unité alpha du récepteur à l'IL-5 (IL-5R $\alpha$ ), et le dupilumab (anti-IL-4R $\alpha$ ), toutes ont fait la preuve de leur efficacité sur la réduction des polypes (Han *et al.* 2021; Claus Bachert *et al.* 2019b; Philippe Gevaert *et al.* 2020; Claus Bachert *et al.* 2022; 2016).

A ce jour, seulement deux biothérapies ont l'AMM dans la PNS seule et sont prescriptibles par les ORL, le dupilumab et le mepolizumab. Le remboursement, en France, ne concerne que les patients atteints de PNS sévère et non contrôlée par la cortisone orale (CSO) et la chirurgie mais les termes de « sévérité » et de « contrôle de la maladie » ne sont pas consensuels. Un panel d'experts français en rhinologie s'est donc constitué pour établir des recommandations nationales sur la prise en charge de la PNS en suivant la méthodologie Delphi (Fink *et al.* 1984). Le premier article associé à ce projet a été soumis pour publication (Carsuzaa *et al.*, *Definition of severity and treatment response in chronic*

*rhinosinusitis with nasal polyps: a Delphi study among French experts*), mais nous manquons de critères validés pour définir précisément la sévérité et le contrôle de la PNS (W. J. Fokkens *et al.* 2020). C'est pourquoi, en lien avec l'actualité thérapeutique, un des enjeux de cette thèse était de proposer un score composite (clinique, radiologique, biologique) créé *in silico* à partir de données cliniques visant à déterminer la sévérité de cette maladie.

La PNS est présentée communément comme un modèle de maladie inflammatoire à éosinophiles mais dans une revue récente de la littérature, un rôle primordial est attribué à la cellule épithéliale dans la pathogénie de la PNS (Wynne *et al.* 2019). Il nous semblait donc intéressant d'étudier les acteurs de l'inflammation T2 et les mécanismes spécifiques conduisant aux dysfonctionnements de la cellule épithéliale afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (Kariyawasam 2019). Un des enjeux de cette thèse était de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques et d'étudier leurs effets sur les fonctions épithéliales. En effet, quelle que soit l'origine de la PNS, cette dernière consiste en réalité en de multiples sous-types biologiques, ou endotypes, qui sont définis par des mécanismes physiopathologiques distincts pouvant être identifiés par des biomarqueurs différents (Anderson 2008; Agache *et al.* 2012; Lötvall *et al.* 2011; Akdis *et al.* 2013). L'éosinophile (Eo) et l'IL-5 ont été rapidement mis en avant comme des éléments clés de la PNS (C. Bachert *et al.* 1997; Rudack, Stoll, et Bachert 1998). L'hypothèse de traitements anti-IgE a suivi et depuis, plusieurs études ont confirmé l'efficacité de ces biothérapies (omalizumab) (Philippe Gevaert *et al.* 2006; 2013; 2011; 2020) comme celles des anti-IL-5 (mépilizumab ou benralizumab) (Cushen et Menzies-Gow 2020; Leckie *et al.* 2000) qui semblent d'une meilleure efficacité (Pfeffer *et al.* 2023). D'autres cytokines médiées par l'inflammation T2 semblent impliquées également dans la PNS, comme l'IL-4 et l'IL-13 (Ordovas-Montanes *et al.* 2018; K. Izuhara, Arima, et Yasunaga 2002), agissant via deux récepteurs différents mais qui partagent une sous-unité commune (la sous-unité alpha du récepteur de l'IL-4, IL-4R $\alpha$ ) (Marsha Wills-Karp et Finkelman 2008). Ainsi, très tôt, l'hypothèse d'un anticorps (Ac) ciblant l'IL-4R $\alpha$  était évoquée pour inhiber la cascade de l'inflammation faisant suite à l'activation de l'IL-4 et de l'IL-13 (Ramalingam *et al.* 2008), il s'agit du dupilumab. D'autres cytokines de l'inflammation T1 de la famille de l'IL-6 comme l'Oncostatin M (OSM) pourraient être des nouvelles cibles thérapeutiques d'intérêt (Stefan Rose-John 2018). En effet, l'OSM a un effet pro-inflammatoire décrit dans de nombreux tissus et notamment sur les cellules de la peau (Rabeony *et al.* 2014; Guilloteau *et al.* 2010). L'OSM et l'IL-6 sont surexprimés dans les polypes de patients atteints de PNS (Pothoven *et al.* 2015; Danielsen *et al.* 2006), l'IL-6 a été déjà beaucoup étudiée concernant son effet sur l'épithélium (Bequignon *et al.* 2020; Carsuzaa *et al.* 2021) mais le rôle de l'OSM dans la pathogénie de la PNS reste largement inconnu (Gubernatorova *et al.* 2018; B.-F. Wang *et al.* 2023).

Un autre défi mérite d'être relevé, c'est celui de la voie d'administration qui pourrait être une limite à l'efficacité et à l'utilisation des biothérapies. Il nous semblait donc important de pouvoir développer d'autres voies d'administration, moins invasives, comme la voie nasale. Dans le cas de la PNS, cela semble être la solution idéale, mais l'accès à ces biothérapies pour la recherche fondamentale était très limité. La recherche académique peut être parfois en conflit avec les services de recherche et développement (R&D) appartenant à l'industrie pharmaceutique et, malgré nos efforts, aucun accord n'a pu être trouvé pour obtenir du dupilumab, du mépolizumab ou les Acs nécessaires à leur identification *in vitro* au sein de culture primaire de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) et cette partie du projet a dû en conséquence être abandonnée (**Annexes 1&2**). En revanche, l'intérêt d'une administration nasale non invasive dépasse largement le cadre de la PNS et des biothérapies qui lui sont liées. Les Ac monoclonaux (AcM) humanisés constituent la classe de médicaments à base de protéines qui connaît la croissance la plus rapide, avec plus de 800 Acs faisant l'objet d'essais cliniques (R.-M. Lu *et al.* 2020). Ces biothérapies sont le plus souvent administrées par voie injectable (intra-veineuse (IV) ou sous-cutanée (SC)) mais elles pourraient être administrées par voie nasale, cette voie ayant fait la preuve de son efficacité en dehors de la PNS pour d'autres médicaments ou vaccins (Ladel *et al.* 2018).

L'enjeu étant majeur, nous avons voulu élargir nos perspectives. L'étude sur l'administration nasale de biothérapies a donc pu se poursuivre grâce à un partenariat mis en place avec une équipe lyonnaise de recherche (UMR 5305), l'équipe Vecteurs colloïdaux et ingénierie thérapeutique ciblée, travaillant au Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique (LBTI), à Lyon. Cette équipe détient une grande expérience en expérimentation animale et en transport transmuqueux, et leur choix s'est porté sur l'étude de l'administration non invasive de facteur anti-hémophilique (FAH) dans le traitement de l'Hémophilie B (HB). Le traitement de référence actuel de l'HB sévère est la prophylaxie, qui consiste en des perfusions IV régulières à long terme (plusieurs fois par mois) de facteur IX recombinant (rFIX) à demi-vie standard (SHL-rFIX) ou à demi-vie prolongée (EHL-rFIX) (Nederlof *et al.* 2020; Arya *et al.* 2022). Il existe un récepteur jouant un rôle clef dans le l'homéostasie et le transport transmuqueux des immunoglobulines (Ig) et des biothérapies, le récepteur néonatal au fragment cristallisable (FcRn) des Ig (mécanisme dose-dépendant) (Challa *et al.* 2014; Andersen *et al.* 2014). Il a prouvé son efficacité dans l'allongement de la demi-vie des biothérapies comme l'EHL-rFIX (Nederlof *et al.* 2020). Le FcRn est exprimé *ex vivo* dans la muqueuse nasale du cornet inférieur et *in vitro* dans les CENH cultivées à l'interface air-liquide (IAL) (Heidl *et al.* 2016; Bequignon *et al.* 2019; Ladel *et al.* 2019). Il est présent dans les trois types cellulaires constitutifs de l'épithélium nasal humain (les cellules basales, à mucus, et ciliées). Afin d'augmenter l'absorption et le transport à travers la muqueuse, une stratégie pourrait consister à cibler ce récepteur exprimé par les cellules épithéliales nasales humaines. En effet, il a fait la preuve de son efficacité au niveau de l'épithélium nasal dans la transcytose de biothérapies comme l'inflximab (Bequignon *et al.* 2019) et l'EHL-rFIX est une molécule de fusion associant rFIX et le fragment Fc d'une Ig. Ainsi l'EHL-rFIX pourrait être reconnu par le FcRn exprimé par les CENH facilitant sa transcytose.

## 2. Projet de thèse

Le projet de cette thèse d'Université était de mener un travail translationnel multi-échelles, depuis le patient jusqu'à la cellule afin de progresser dans les domaines physiopathologiques et thérapeutiques de la PNS. Ainsi, les objectifs de cette thèse étaient répartis en 3 axes :

**Axe 1 : Elaborer et diriger sur le plan national une étude clinique multicentrique (étude PSI pour *Polyposis Severity Index*) pour créer un score composite (clinique, radiologique, biologique) *in silico* visant à déterminer la sévérité de cette maladie.**

Le remboursement de ces biothérapies en France est conditionné par le diagnostic d'une PNS sévère et non contrôlée malgré une prise en charge chirurgicale et la CSO, mais les termes (sévère, contrôlée et chirurgie) ne sont pas consensuels.

Pour atteindre cet objectif, nous menons au niveau national une étude multicentrique, prospective, ouverte et observationnelle depuis le mois de janvier 2022. Le critère d'évaluation principal est défini par la valeur estimée des coefficients structurels mettant en relation chacun des indicateurs mesurables de la PNS avec la variable latente endogène : la sévérité de la maladie (score PSI). Le nombre de sujets nécessaire a été calculé à 650 sur une période prévue initialement d'au minimum 2 ans avec 7 centres participants en France.

Les résultats de cette étude *in silico* devraient permettre d'établir un score de sévérité de la PNS utilisable en routine permettant une prise en charge personnalisée des patients et ils seront présentés sous la forme d'une publication scientifique dans une revue internationale lorsque les inclusions seront terminées.

**Axe 2 : Caractériser *in vitro* les effets de l'OSM sur l'épithélium nasal humain et les dysrégulations épithéliales induites par les IL-4 et IL-13 en l'absence et en présence de dupilumab.**

Alors que l'effet de certaines cytokines d'intérêt de l'inflammation T2 (IL-4, IL-13) et T1 (IL-6) a déjà été largement étudié à l'échelle des cellules de l'immunité, l'effet direct des cytokines et l'action des biothérapies sur la cellule épithéliale nasale humaine est beaucoup moins caractérisée alors que l'agression de la barrière épithéliale et la dysrégulation de la réparation de l'épithélium joueraient aussi un rôle clé dans la pathogénie de la PNS.

Il nous semblait donc important d'évaluer *in vitro* les effets de l'IL-4, de l'IL-13 et du dupilumab en présence de ses cytokines cibles dans un modèle de cultures primaires de CENH. Par ailleurs, si plusieurs cytokines sont connues pour être impliquées dans la physiopathologie de la PNS, il nous a semblé important d'évaluer les effets de cytokines encore peu ou pas étudiées dans la PNS comme l'OSM, dans l'idée d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. L'objectif était donc d'évaluer les effets *in vitro* des cytokines, en particulier celles de la famille des IL-6 (OSM et IL-6) mais aussi l'IL-4 et l'IL-13 sur les processus de réparation épithéliale après blessure, sur la fonction de barrière épithéliale et sur l'efficacité du battement ciliaire. Pour cela, j'ai pu utiliser un modèle de cultures primaires de CENH (obtenues à partir de déchets opératoires de polypes) cultivées en interface air-liquide (IAL) développé depuis plus de vingt-cinq ans dans l'unité de recherche du Pr. Coste. Outre l'avantage de pouvoir travailler sur des cellules épithéliales humaines, ce modèle permet d'obtenir un épithélium proche des conditions *in vivo* (Coste, Rateau, Bernaudin, *et al.* 1996).

Deux études sur les cytokines impliquées dans la PNS ont été réalisées en parallèle : i) Une première dont l'objectif était de poursuivre les travaux de thèse d'Université menés par le Dr. Emilie Béquignon (Bequignon *et al.* 2020) et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (OSM) dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC, Poitiers, France) et la thèse d'Université d'un autre doctorant, le Dr. Florent Carsuzaa. Cette étude a été publiée dans *l'International Journal of Molecular Science (IJMS)*, IF = 6, rang B), elle est intitulée

*Oncostatin M Contributes to Airway Epithelial Cell Dysfunction in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps* ; ii) Une deuxième étude sur l'IL-4, l'IL-13 et le dupilumab dont l'objectif était d'évaluer *in vitro* l'effet du dupilumab à l'échelle cellulaire sur les potentielles dysfonctions épithéliales induites par les cytokines, dont le manuscrit a été soumis pour publication dans le *Journal of Allergy and Clinical Immunology (JACI, IF=14, rang A)*, et elle est intitulée *Dupilumab restores nasal epithelial barrier functions altered by IL-4 in vitro : additional proof for its efficacy*.

**Axe 3 : Evaluer l'efficacité d'une nouvelle voie d'administration nasale non invasive *in vivo* en prenant l'exemple de l'Eftrenonacog alfa, une biothérapie utilisée dans le traitement de l'Hémophilie B (rFIX-Fc).**

Notre équipe a précédemment démontré l'intérêt du FcRn pour le passage à travers l'épithélium nasal d'une biothérapie, l'infliximab (Bequignon *et al.* 2019), ouvrant la réflexion sur le potentiel d'administration par voie nasale de biothérapies utilisables dans la PNS mais également d'autres biothérapies utilisables pour le traitement d'autres pathologies. Pour poursuivre cette thématique, en collaboration avec le LBTI, j'ai élaboré un protocole d'expérimentation animale sur modèle murin pour étudier l'administration nasale de FAH appliqué à l'HB qui a été accepté par le Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'Ecole Normale Supérieure, au Plateau de Biologie et d'Expérimentation sur la Souris (PBES) et au laboratoire P4 (CECCAPP) (le protocole complet qui a été accepté fait 42 pages et une partie étant confidentielle, il n'est pas joint à ce document mais peut être délivré aux membres du jury sur demande).

Les résultats de ce travail sont en deux parties : un projet de maturation faisant suite à un dépôt de brevet auprès du CNRS pour lesquels les résultats menés sur l'HB et l'administration non invasive de FAH modifiés sont confidentiels, et un projet d'administration nasale de d'Eftrenonacog alfa, du facteur IX (FIX) recombinant fusionné au fragment Fc d'une Ig. Le travail mené sur cette deuxième partie a fait l'objet d'une revue systématique de la littérature sur le FcRn publiée dans *IJMS (IF = 6, rang B)* intitulée *FcRn as a Transporter for Nasal Delivery of Biologics: A Systematic Review*, et d'un *brief report* soumis à *Journal of Thrombosis and Haemostasis (JTH, IF = 16, rang A)*, pour lequel les révisions sont en attente, intitulé *In vivo intranasal delivery of coagulation factor IX: a proof-of-concept study*.



## Axe 1 :

Développement d'un score de sévérité de  
la PNS pour guider les indications de  
biothérapies



# 1. Introduction

L'avènement des biothérapies dans la prise en charge de la PNS se confronte aux nombreux phénotypes de cette pathologie encore mal identifiés. Ainsi, l'efficacité thérapeutique est parfois spectaculaire, en revanche certains patients ne semblent pas répondre au traitement. Les critères européens nécessaires à la prescription de biothérapies sont clairement définis : i) une perte de l'odorat (anosmie confirmée par test olfactif psychophysique) ; ii) une altération de la qualité de vie (score de symptômes nasosinusiens (SNOT) à 22 items, SNOT-22>40) ; iii) l'association à un asthme (asthme avec CSI régulièrement nécessaire) ; iv) la nécessité d'une CSO dans les 2 ans (>2 cures de corticoïdes per os par an ou CSO au long cours >3 mois à faible dose) ; et v) une inflammation de type T2 (Hyperéosinophilie tissulaire > 20% ou Hyperéosinophilie sanguine >250/mm<sup>3</sup> ou IgE totales >100 kUI/L) dans les résultats des analyses biologiques. Devant la présence d'une polypose bilatérale en fibroscopie, parmi les critères évoqués plus tôt, 3 sont nécessaires chez des patients déjà opérés et 4 si les patients n'ont jamais été opérés. Mais ces critères européens n'ont pas été retenus par la Haute Autorité de Santé française qui a validé l'AMM du dupilumab dans les PNS sévères résistantes au traitement médical et non contrôlées par la chirurgie sinusienne. Cependant les termes de sévérité et de contrôles de la PNS ne sont pas clairement définis à ce jour en France.

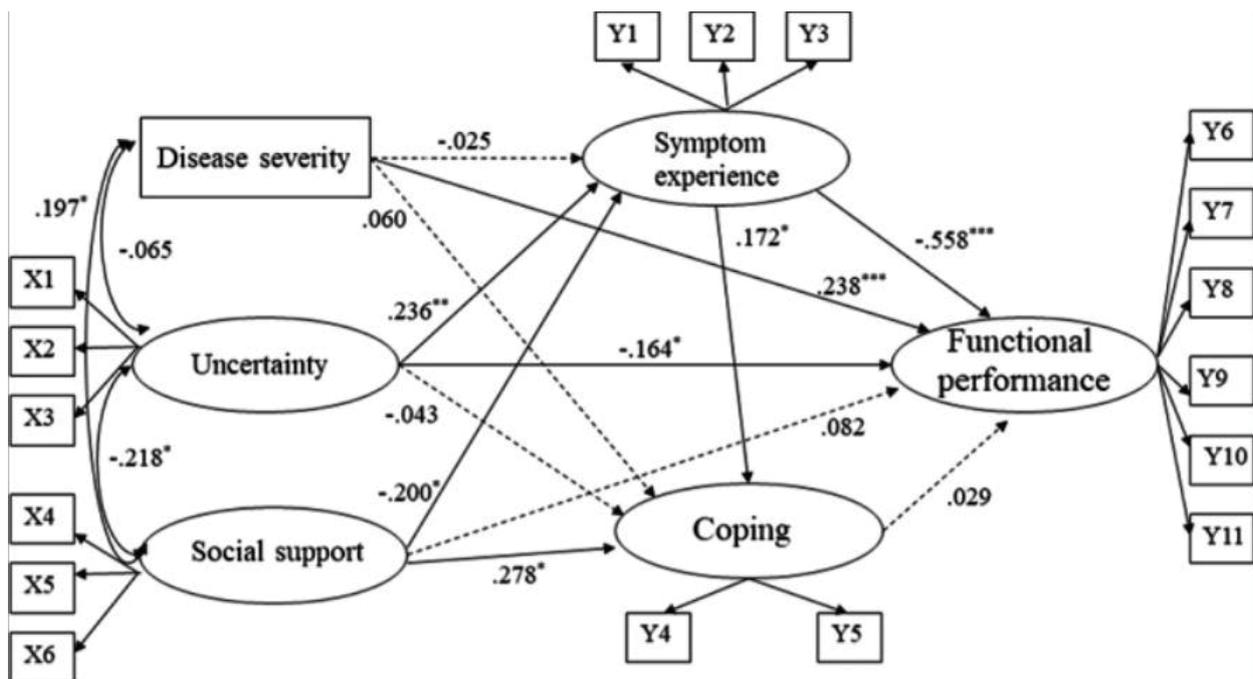
Alors que l'arsenal thérapeutique des ORL s'étoffe, il n'existe aucune évaluation systématisée prenant en compte l'ensemble des principaux signes fonctionnels, physiques, biologiques, radiologiques et leurs impacts sur la qualité de vie permettant d'établir la sévérité de la PNS, utilisable en intra-individuel et en inter-individuel par les praticiens ORL francophones (Kacha, Guillemin, et Jankowski 2012). En pneumologie, la sévérité de l'asthme est évaluée en fonction de la fréquence des symptômes diurnes, nocturnes, de la valeur du débit expiratoire de pointe (DEP) et de sa variabilité, le contrôle de l'asthme est lui évalué rétrospectivement à partir du niveau de traitement nécessaire pour contrôler les symptômes et les crises. Ainsi, l'asthme léger est un asthme qui peut être contrôlé avec un traitement de stade 1 ou 2. Un asthme sévère est un asthme qui requiert un traitement de stade 4 ou 5 pour maintenir le contrôle des symptômes (Bousquet *et al.* 2007). Les directives du GINA ont défini le terme « contrôle » comme la gestion efficace des caractéristiques cliniques de la maladie, y compris les symptômes, le réveil nocturne, l'utilisation de médicaments de secours, la limitation de l'activité et la fonction pulmonaire, ainsi que le risque futur d'effets indésirables (EI) (Reddel *et al.* 2015).

Nous émettons l'hypothèse qu'une stratégie d'évaluation similaire à celle de l'asthme pourrait être appliquée à la PNS. Ainsi, l'importance des symptômes, des facteurs anatomiques et biologiques, de l'estimation de la qualité de vie des patients, du niveau de consommation de soins et du nombre de chirurgies deviennent tous un reflet direct de la sévérité et du contrôle de la PNS. L'originalité et le caractère innovant de ce projet sont la modélisation statistique sous-jacente à la création du score. En effet, de nombreux scores existent déjà dans la littérature pour estimer la sévérité des symptômes, l'importance endoscopique de la polypose et l'atteinte sinusienne radiologique (Lund et Mackay 1993a; C. Hopkins *et al.* 2009). De plus, des seuils ont été définis pour estimer l'importance de l'inflammation T2 (Claus Bachert *et al.* 2020). Néanmoins, aucun score à ce jour ne tient compte de l'ensemble de ces mesures pour définir des phénotypes de sévérité clairement identifiés. Le modèle à équations structurelles, ou modèle à variables latentes (VL), est un modèle considérant que la sévérité globale de la PNS peut être reflétée par différentes dimensions, chacune de ces dimensions étant construite à partir de différents marqueurs de la maladie (mesurés par des scores différents, continus ou catégoriels pour chaque dimension) que l'on appelle indicateurs (Bentler 1995). Les domaines et la sévérité globale de la PNS qui en résultent ne sont pas mesurés directement ; il s'agit de VL, évaluées à partir des différents indicateurs. Au cours de la construction du modèle, il faut déterminer le nombre de domaines, les relations entre les domaines, les indicateurs reliés à chaque domaine, et la force du lien entre chaque indicateur et un domaine donné. Les différents critères cliniques et paracliniques historiquement utilisés

séparément pour évaluer la sévérité pourraient se révéler en fait peu pertinents et à l'inverse certains critères encore peu usités en pratique courante pourraient démontrer leur fiabilité. Parmi les différents indicateurs de mesures recueillis, certains ont entre eux des liens plus étroits car ils sont le reflet du même concept sous-jacent (*i.e.* la même VL sous-jacente), comme l'hyperéosinophilie et les IgE totales augmentées pour la sévérité biologique. Le modèle de mesure correspond au modèle reliant les indicateurs aux VLs qu'ils renseignent (sévérité clinique, endoscopique, biologique et scanographique). Le modèle structurel correspond aux liens entre les différentes VLs retenues, et à leur lien avec la sévérité globale de la PNS. Le modèle à VL est un modèle statistique associant un modèle de mesure et un modèle structurel. De tels modèles ont déjà été utilisés pour définir les capacités fonctionnelles dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) comme illustré dans la **Figure 1** (Jun et Kang 2023).

La détermination robuste d'indicateurs fiables de sévérité permettrait une prise en charge thérapeutique personnalisée et serait utile dans la prise de décision thérapeutique et le suivi. Ainsi, il serait possible de proposer d'emblée une escalade thérapeutique pour les patients sévères et au contraire être le moins invasif possible chez les patients présentant une forme légère de la maladie puis de s'adapter tout au long du suivi de ces patients porteurs d'une maladie chronique.

L'objectif principal était donc d'établir un score composite de sévérité de la PNS à partir d'un modèle à VL prenant en compte l'ensemble des facteurs cliniques et paracliniques potentiellement associés à la sévérité de cette maladie.



**Figure 1. Exemple d'un modèle à équations structurelles appliquées à l'impact de la BPCO**

Les performances fonctionnelles du patient sont rattachées à différents indicateurs mesurables que sont les variables comme la sévérité, l'entourage, les symptômes et leurs coefficients X1 à X6 et Y1 à Y11.

Source : (Jun et Kang 2023)

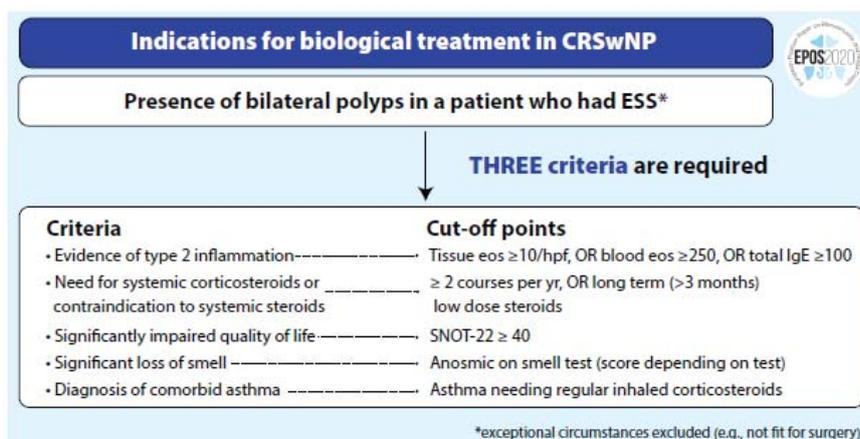
## 2. Rappels : Modèles à équations structurelles

### 2.1. Indications des biothérapies dans la PNS

Selon les experts de l'EUFORÉA (Wytske J. Fokkens *et al.* 2019), cinq critères doivent être pris en compte avant de prescrire des biothérapies chez des patients atteints de PNS ayant été opérés : la preuve biologique d'une inflammation T2, les besoins en CSO au cours des deux dernières années, une altération significative de la qualité de vie, une perte d'odorat importante et un asthme comorbide. Il a été conclu que les biothérapies seraient indiquées chez les patients opérés présentant une PNS avec des polypes bilatéraux répondant à trois des cinq critères cités précédemment. Ensuite, selon l'EPOS (W. J. Fokkens *et al.* 2020), 5 critères pour les biothérapies dans la PNS ont été retenus (**Figure 2**) :

- le recours à des CSO dans les 2 dernières années (définis comme la consommation de plus de 2 cures par an de CSO ou des CSO au long cours pendant une durée supérieure à 3 mois) ou une contre-indication aux CSO ;
- une preuve de maladie inflammatoire T2 (hyperéosinophilie sanguine  $> 250/\text{mm}^3$ ) ;
- une dégradation significative de la qualité de vie (SNOT-22  $> 40$ ) ;
- une perte significative de l'odorat ;
- un asthme associé.

Les auteurs considèrent que pour être éligible à une biothérapie, 3 critères doivent être remplis sur 5 pour les patients présentant des antécédents de chirurgie pour PNS ; et 4 critères sur 5 chez les patients sans antécédent de chirurgie pour PNS. Après 16 semaines (16S) de traitement et en l'absence de réponse à ces critères, le traitement par biothérapie doit être interrompu. Dans le cas contraire, le traitement est poursuivi et à nouveau évalué après 1 an. La réponse aux biothérapies devrait être évaluée selon les critères suivants : la réduction de la taille des polypes nasaux, la réduction du recours aux CSO, l'amélioration de la qualité de vie, l'amélioration de l'odorat, et la réduction de l'impact des comorbidités (Avis de la Haute Autorité de Santé, HAS). Selon cette dernière, en France, l'autorisation de prescription du dupilumab et du mépolizumab est plus restrictive que l'AMM européenne : ces biothérapies peuvent être prescrites en traitement additionnel aux CS par voie nasale pour les patients adultes ayant une PNS sévère insuffisamment contrôlée par des CSO et par la chirurgie, ce qui rend cette dernière indispensable avant de prescrire une biothérapie. Les termes « sévère » et « contrôle » ne sont pas clairement définis, c'est pourquoi nous avons choisi de mener une étude nationale basée sur les modèles à équations structurelles pour pouvoir aboutir à un consensus.



**Figure 2. Indications de prescriptions de biothérapies dans la PNS selon l'EPOS**

Source : (W. J. Fokkens *et al.* 2020)

## 2.2. Les propriétés métrologiques d'un score

Un score ou index de sévérité est un outil standardisé produisant une mesure subjective. Sa construction résulte d'une sélection des différents libellés et items correspondants à partir d'un travail qualitatif d'experts du domaine. La plupart du temps, l'avis d'au moins deux experts est nécessaire (Fermanian 2005) afin de pouvoir vérifier la concordance de leurs jugements. Le Pr. André Coste et la Dr. Emilie Béquignon ont été sollicités pour leur expertise en rhinologie. Une fois développé, un score nécessite de passer par plusieurs étapes de validation. En effet, pour donner des résultats fiables, un score doit posséder les trois qualités psychométriques d'un bon instrument de mesure : validité, fidélité et sensibilité au changement (Fermanian 2005). Cette validation des propriétés métrologiques d'un score est d'abord quantitative pour évaluer si le score mesure bien ce pourquoi il a été développé (validité). Cette validation se fait d'abord contre critère, c'est-à-dire que les résultats du nouveau score sont comparés à un score de référence. Dans le cadre de cette étude, aucun score de sévérité de référence n'existe et une telle évaluation ne pourra être réalisée. En revanche, une validation convergente et divergente du score pourra être menée en évaluant les potentielles relations entre le score et d'autres variables. Par exemple, est ce que le score augmente quand un score de qualité de vie augmente (validation convergente entre score de qualité de vie et score de sévérité) ? Les tests utilisés pour la validation ne peuvent pas faire partie d'éléments inclus dans le score de sévérité composite développé initialement. Ainsi, le SNOT-22 ne pourra pas être utilisé pour la validité convergente ou divergente car il fait partie des indicateurs du modèle (Piccirillo, Merritt, et Richards 2002). Ensuite, la validité de construit concerne la structure de l'échelle et la façon dont les différents items se regroupent en dimensions (fidélité). L'objectif est d'évaluer si les différents items reflètent bien la dimension dans laquelle ils ont été inclus et si le nombre de dimensions estimé est le bon. Dans cette étude, les dimensions correspondent aux différentes VLs renseignant toutes de façon plus ou moins importante la sévérité de la PNS. Enfin, la sensibilité au changement pourra être évaluée car deux visites sont prévues avec un intervalle suffisant pour conduire à un changement d'état du patient.

## 2.3. Le package lavaan

Une librairie ou « package » du logiciel R (v.4.1.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) a été développée dans le but de construire et évaluer des modèles à équations structurelles. Cette librairie appelée lavaan est un acronyme signifiant Latent VARIables ANalysis (The lavaan tutorial, Yves Rosseel, Department of Data Analysis, Ghent University (Belgium), August 2, 2020). Les modèles d'équations structurelles sont utilisés dans de nombreux domaines scientifiques (économie, sciences sociales et psychologie). Le terme structurel signifie que l'équation mathématique sous-jacente doit décrire un lien de causalité entre les différents éléments reliés entre eux par les flèches. L'intérêt des modèles d'équations structurelles est qu'ils permettent l'utilisation des VL. Ces variables dont la mesure directe n'est pas possible peuvent néanmoins se voir attribuer une valeur en mesurant leurs effets. Par exemple, on ne peut pas directement mesurer le risque cardio-vasculaire d'un patient, mais le risque cardio-vasculaire est basé sur un ensemble d'anomalies que l'on peut mesurer, la tension artérielle, le surpoids ou encore l'hypercholestérolémie. A partir de ce « package » lavaan disponible au sein des archives du logiciel Comprehensive R Archive Network (CRAN), le modèle peut être personnalisé pour définir les variables et leurs liens.

### 2.3.1. La syntaxe lavaan

La syntaxe de modèle statistique dans le cadre d'un *package* correspond à la description du modèle à estimer selon les modalités prédéfinies par le *package*. Premièrement, vous trouverez ci-dessous, quelques éléments de la syntaxe lavaan, puis plus de détails seront donnés sur la construction du modèle. Dans l'environnement R, une formule de régression a la forme suivante :  $z \sim x_1 + x_2 + x_3 + x_4$ . Dans cette formule, le tilde ( $\sim$ ) est l'opérateur de régression. Du côté gauche de l'opérateur, nous avons la variable dépendante ( $y$ ) et du côté gauche, les variables indépendantes ( $x$ ), séparées par l'opérateur (+). En lavaan, un modèle typique est simplement un ensemble (ou un système) de formules de régression, où certaines variables (notées ici par un ( $f$ )) peuvent être latentes.

Par exemple :  $z \sim f_1 + f_2 + x_1 + x_2$  ou  $f_1 \sim f_2 + f_3$ , ou encore  $f_2 \sim f_3 + x_1 + x_2$

Dans un modèle, chaque VL doit être définie en établissant la liste de ses indicateurs (mesurables ou latents). Pour ce faire, nous utilisons l'opérateur spécial ( $=\sim$ ), qui peut être lu comme « est mesuré par », ou « est reflété par ».

Par exemple, pour définir les trois VL  $f_1$ ,  $f_2$  et  $f_3$ , nous pouvons utiliser les formules suivantes :  $f_1 =\sim y_1 + y_2 + y_3$  ou  $f_2 =\sim y_4 + y_5 + y_6$  ou  $f_3 =\sim y_7 + y_8 + y_9 + y_{10}$

De plus, les variances et covariances sont spécifiées en utilisant l'opérateur « double tilde », par exemple :  $y_1 \sim\sim y_1$  # variance ou  $y_1 \sim\sim y_2$  # covariance ou  $f_1 \sim\sim f_2$  # covariance

La définition des variances permet simplement de les nommer, pour les retrouver ensuite dans les résultats du modèle. La définition des covariances rajoute quant à elle une information au modèle : elle rajoute des liens entre des variables ou des VL qui ne sont pas explicables directement par les équations structurelles. Par exemple, pour une variable latente reflétée par quatre indicateurs, il se peut que deux des indicateurs soient plus en lien entre eux qu'avec les deux autres : on ajoute alors un terme de covariance entre eux, qui explique leur relation au-delà de celle d'être simplement le reflet de la même VL. Enfin, les coefficients (ou intercepts) pour les variables mesurables et les VL sont des formules de régression simple avec seulement un intercept (explicitement désigné par le chiffre 1) comme seul prédicteur :  $y_1 \sim 1$  et  $f_1 \sim 1$

Ces quatre types de formules permettent de décrire une grande variété de modèles de VL. La syntaxe d'un modèle lavaan complet est simplement une combinaison de ces types de formules, permettant de préciser le modèle qui sera utilisé. L'ensemble actuel des formules à disposition est résumé dans le **Tableau 1**.

Formule	Type	Opérateur mnémotechnique
définition de la variable latente	$=\sim$	est mesuré par
35récédemme	$\sim$	est régressé sur
(résidu) (co)variance	$\sim\sim$	est corrélé avec
ordonnée à l'origine	$\sim 1$	une constante à l'origine

**Tableau 1. Synthèse de la syntaxe lavaan pour définir le modèle**

La raison pour laquelle la syntaxe d'un modèle peut être si courte est qu'un certain nombre de relations est spécifié par défaut. Premièrement, les loading facteurs sont définis par défaut, et pour chaque VL, un des loading facteurs est fixé à un pour assurer l'identifiabilité d'une VL (et fixé l'échelle de la VL). Deuxièmement, les variances résiduelles sont ajoutées automatiquement pour les indicateurs. Et troisièmement, toutes les variables latentes exogènes sont corrélées entre elles par défaut. De cette manière, la syntaxe du modèle peut rester concise. D'autre part, l'utilisateur garde le contrôle, puisque tout ce comportement « par défaut » peut être remplacé et/ou désactivé.

### 2.3.2. Construire le modèle

La première étape est de construire le modèle théorique. Cette étape correspond à décrire les hypothèses qualitatives concernant les relations causales entre les variables du modèle d'équations structurelles. On crée un objet qui donnera les équations du modèle, voici un exemple avec quelques variables de notre jeu de données (`data_PSI`), le modèle s'appelle `Model_PSI` :

```

Model_PSI = `# Définition des variables latentes
Biologie =~ x1 + a*x2
    Avec x1 = IgE totales
    Avec x2 = Polynucléaires éosinophiles
36récédemm =~ y1 + a*y2 + b*y3 + c*y4
    Avec y1 = présence ou non d'une otite séro-muqueuse
    Avec y2 = EVA obstruction nasale
    Avec y3 = EVA odorat
    Avec y4 = EVA rhinorrhée postérieure
Anatomie =~ y5 + a*y6
    Avec y5 = score endoscopique de polypes
    Avec y6 = score radiologique de Lund-McKay
Qualité de vie =~ a*y8
    Avec y8 = questionnaire SNOT-22
Comorbidités =~ x3 + x4 + x5 + x6 + x7
    Avec x3 = Age
    Avec x4 = Atopie
    Avec x5 = Asthme
    Avec x6 = Intolérance Aspirines/Sulfites
    Avec x6 = Tabac

# Régressions
Qualite de vie ~ 36récédemm + Anatomie
Severite ~ Biologie
Severite ~ Thérapeutiques
Severite ~ 36récédemm + Anatomie + Thérapeutiques + Qualite de vie
Severite ~ Comorbidités
# Corrélations résiduelles (non exhaustives)
y1 ~~ y3 + y4
y2 ~~ y3 + y4
y3 ~~ y1 + y2
y4 ~~ y1 + y2'

```

Ainsi, nous avons créé un objet appelé `model_PSI` qui contient du texte entre deux apostrophes ( ` ). Ce texte constitue les équations du modèle. La syntaxe des équations est relativement simple à comprendre. On peut utiliser le `#` pour inscrire des commentaires (en italique), par exemple « `# Définition des variables latentes` » est un commentaire qui ne sera pas considéré comme une équation. Le symbole `=~` est utilisé pour définir une variable latente. Ainsi « `Biologie =~ x1 + a*x2` » définit la VL `Biologie`, qui ne fait pas partie du jeu de données, comme étant une fonction des variables `x1` et `x2`, qui, elles, sont des variables observées appartenant au jeu de données (résultats issus de la prise de sang). Le symbole `~` est utilisé pour représenter une régression. Ainsi, `Qualite de vie ~ 36récédemm + Anatomie` indique que le modèle comporte une régression linéaire où `Qualite de vie` est la variable dépendante et `36récédemm` et `Anatomie` sont les variables explicatives. Le symbole `~~` est utilisé pour représenter des termes de covariances (soit entre des variables du modèle, soit entre des erreurs résiduelles). Par exemple `y1 ~~ y3 + y4` signifie que le modèle doit permettre à la variable `y1` d'être corrélée avec `y3` et avec `y4`. On peut ensuite facilement imposer des contraintes aux paramètres du modèle selon les besoins.

### 2.3.3. Ajuster le modèle

On peut ensuite estimer les paramètres du modèle avec la fonction `sem`. L'étape d'estimer consiste à mettre en lien les données disponibles et le modèle construit ; l'estimation des paramètres repose sur la maximisation (ou la minimisation) d'une fonction. Les principales méthodes d'estimation des paramètres dans lavaan sont : `missing`, `estimator`, `standard errors` ou encore `bootstrap`. Dans sa forme la plus simple, la fonction `sem` ne requiert que le modèle décrit précédemment (`Model_PSI`) et le jeu de données (extraction des données issues du e-CRF qu'on appellera `data_PSI` pour la suite) : `fit = sem (Model_PSI, data=data_PSI)`.

D'autres arguments peuvent être utilisés en fonction des hypothèses émises, en revanche aucun n'est obligatoire pour que l'équation `sem` fonctionne. Le détail est accessible au sein du tutorial lavaan (The lavaan tutorial, Yves Rosseel, Department of Data Analysis, Ghent University (Belgium), August 2, 2020).

### 2.3.4. Travailler avec des variables catégorielles

Les variables binaires, ordinales et nominales sont considérées comme catégorielles dans le cadre d'un modèle à VL (et non continues). Le fait que ces variables catégorielles soient exogènes (indépendantes) ou endogènes (dépendantes) dans le modèle a une grande importance et une attention particulière à leur codage est nécessaire.

Variables catégorielles exogènes : lorsqu'une variable exogène est binaire (sexe ou présence d'une otite séro-muqueuse), il faut la recoder en tant que variable nominale (0/1), comme dans un modèle de régression linéaire ou logistique classique. Lorsqu'une variable exogène est ordinale, un codage reflétant l'ordre des différentes catégories doit être utilisé (1, 2, 3, 4 etc..) ; la variable sera ensuite traitée comme une variable numérique. Enfin, lorsqu'une variable est catégorielle avec  $n > 2$  niveaux, il faut remplacer chaque niveau par une variable nominale (0/1), de la même façon que dans une régression classique.

Variables catégorielles endogènes : la librairie lavaan peut traiter des variables endogènes binaires et ordinales (mais pas nominales). Seule l'approche des moindres carrés en trois étapes est actuellement supportée, y compris certaines variantes plus robustes. Ainsi, pour pouvoir utiliser des données binaires/ordinales, il existe certaines possibilités dont le détail est accessible au sein du tutoriel lavaan (The lavaan tutorial, Yves Rosseel, Department of Data Analysis, Ghent University (Belgium), August 2, 2020).

### 3. Problématique

Le remboursement des biothérapies ayant l'AMM en France dans la PNS seule est conditionné par le diagnostic d'une PNS sévère et non contrôlée malgré une prise en chirurgicale et la CSO, mais les termes (sévère, contrôlée et chirurgie) ne sont pas consensuels.

- La sévérité a été définie il y a longtemps à l'aide de critères cliniques et de qualité de vie dans l'asthme, est-ce possible de faire une synthèse de critères similaires appliqués à la PNS ?
- Le contrôle de l'asthme a été défini à l'aide d'un questionnaire se basant sur la consommation de soins et la fréquence des exacerbations dans l'asthme, est-ce possible de faire une synthèse de critères similaires appliqués à la PNS ?
- La sévérité et le contrôle sont-ils vraiment dissociables dans la PNS ou la sévérité doit-elle prendre en compte la consommation de cortisone ?
- Quelle technique chirurgicale fait référence pour conclure à un échec de la chirurgie et proposer une alternative thérapeutique ?
- Quelle est la population cible des biothérapies ?
- Qui sont les patients répondeurs ?

Devant ces multiples interrogations qui animent la communauté scientifique des rhinologistes, plusieurs démarches pour y répondre ont été mises en place. Des recommandations nationales sur la prise en charge de la PNS sont coordonnées par le Pr. Papon, un registre national des patients mis sous biothérapies a été mis en place par le Pr. Mortuaire, une revue systématique de la littérature a été coordonnée par le Pr. Mortuaire et le Pr. Rumeau pour évaluer les indications chirurgicales dans la PNS et les facteurs prédictifs de succès en fonction du type d'interventions réalisées auxquels j'ai pu participer soumis pour publication à l'*European Journal of Medical Research (Surgical management in chronic rhinosinusitis with nasal polyps : a review ; Fieux M, Rumeau C, De Bonnecaze G, Michel J, Papon JF, Mortuaire G)*, et un état des lieux issu des données PMSI sur la chirurgie sinusienne en France a été coordonné par le Pr. Papon identifiant à environ 5000 personnes la population cible éligible aux biothérapies en France (Fieux *et al.* 2022). Nous avons choisi dans le cadre de cette thèse, de se concentrer sur la définition des termes « sévérité » et « contrôle ». Pour répondre à cet objectif, nous menons au niveau national une étude multicentrique, prospective, ouverte et observationnelle depuis le mois de janvier 2022 dont seules les méthodes vous seront détaillées car les inclusions sont encore en cours.

Les résultats de cette étude *in silico* devraient permettre d'établir un score de sévérité de la PNS utilisable en routine permettant une prise en charge personnalisée des patients.

## 4. Méthodes pour l'étude *Polyposis Severity Index (PSI)*

### 4.1. Méthodologie de la recherche

#### 4.1.1. Type d'étude

Il s'agit d'une étude multicentrique (7 centres en France), prospective, ouverte et observationnelle dont les détails sont disponibles sur le site [ClinicalTrials.gov \(NCT05056714\)](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT05056714). Tout sujet participant à l'étude est informé des modalités et de l'intérêt du protocole, et accepte librement la participation à l'étude.

#### 4.1.2. Objectif principal

L'objectif principal est la construction d'un modèle à variables latentes reliant les différents indicateurs mesurés chez les patients aux domaines sous-jacents, et d'établir le lien entre ces domaines et la sévérité latente de la PNS (score PSI). La construction du modèle à VL repose sur les items suivants :

i/ Interrogatoire : âge, taille, poids, comorbidités (atopie, asthme, syndrome d'apnée hypopnée du sommeil (SAS), otite séro-muqueuse, reflux gastro-oesophagien (RGO), intolérance à l'aspirine, intolérance aux sulfites, tabac), antécédents chirurgicaux des sinus, sévérité de l'asthme, échelle visuelle analogique (EVA) intensité et fréquence des symptômes rhinosinusiens (rhinorrhée antérieure, rhinorrhée postérieure, obstruction nasale, douleurs sinusiennes, troubles de l'odorat, troubles du sommeil), dysgueusie, dysosmie

ii/ Examen physique : otoscopie, score de polypes nasaux endoscopiques

iii/ Examens complémentaires : scanner des sinus (score de Lund MacKay), éosinophilie sanguine, dosage des IgE totales sanguines.

Iv/ Le contrôle de la maladie : quantité de corticoïdes oraux consommés (dose annuelle totale cumulée en équivalent prednisolone), nombre d'interventions sinusiennes, biothérapies (oui/non).

Le modèle est ajusté sur l'ancienneté de la PNS.

## 4.2. Population étudiée

### 4.2.1. Centres participants

La participation à l'étude est proposée à tous les patients (conformément aux critères d'inclusion ci-dessous) consultant pour une PNS (diagnostic initial ou suivi) en ORL au Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil (CHIC) et CHU Henri Mondor de Créteil, au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Lille, aux CHU Lariboisière et Kremlin Bicêtre de Paris, aux Hôpitaux Universitaires de Marseille Conception, à l'hôpital universitaire de Lyon Sud et de la Croix Rousse à Lyon. La période de recueil s'étend du 24/09/2021 au 31/12/2023 et le détail des centres apparaît dans le **Tableau 2**.

N°	Nom du centre	Adresse	Nom de l'investigateur principal	Prénom de l'investigateur principal
1	Service ORL et de chirurgie cervico-faciale Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil	40 Avenue de Verdun, 94000 Créteil	Coste	André
2	Service d'ORL et de chirurgie cervico-faciale, CHU Lille	Rue Michel Polonovski, Hôpital Huriez, 59000 Lille	Mortuaire	Geoffrey
3	Service ORL et de chirurgie cervico-faciale, AP-HP Hôpital Kremlin Bicêtre	78 rue du Général Leclerc 94270 Kremlin Bicêtre	Papon	Jean François
4	Service ORL et de chirurgie cervico-faciale, CHU La conception	147 Boulevard Baille, 13005 Marseille	Michel	Justin
5	Service ORL et de chirurgie cervico-faciale, CHU Lyon Sud	165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre Bénite	Fieux	Maxime
6	Service ORL et de chirurgie cervico-faciale, Hôpital de la Croix Rousse	103 Grand Rue de la Croix Rousse, 69004 Lyon	Daveau	Clémentine
7	Service ORL Hôpital Henri Mondor AP-HP	51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil	Bartier	Sophie
8	Service ORL et de chirurgie cervico-faciale, Hôpital Lariboisière	2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris	Verillaud	Benjamin

**Tableau 2. Noms et adresses des centres participants à l'étude *Polyposis Severity Index* (PSI)**

### 4.2.2. Critères d'inclusion

Les patients inclus sont tous les patients, volontaires, adultes (> 18 ans), ayant donné leur consentement à la participation à l'étude, et présentant une PNS (12) : 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
- Eternuements et/ou prurit nasal

Ces symptômes doivent être associés à :

- Des signes endoscopiques de polypes nasaux
- Des opacités diffuses bilatérales nasosinusiennes à la TDM ou Cone Beam Computed Tomography (CBCT).

### 4.2.3. Critères de non-inclusion

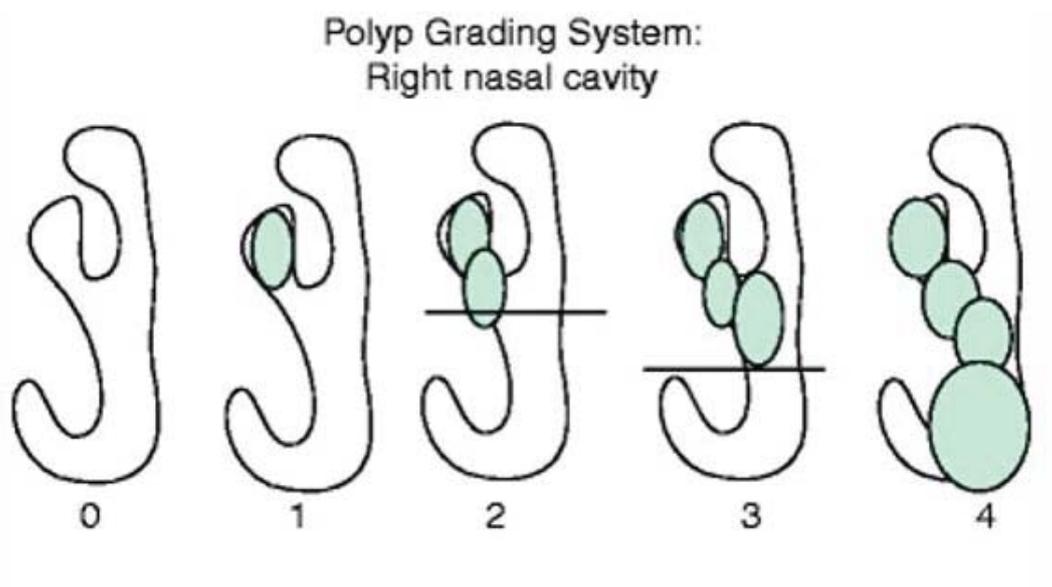
1. Personne ne parlant ou ne comprenant pas le français
2. Antécédent de chirurgie de la base du crâne pour tumeurs
3. Antécédent de traumatisme crânio-facial majeur
4. Antécédent de radiothérapie cérébro-faciale ou chimiothérapie
5. Antécédent de pathologie neurologique inflammatoire ou neurodégénérative
6. Maladie de système associé à la présence de polypes sinusiens (Granulomatose avec polyangéite, mucoviscidose, dyskinésie ciliaire primitive, déficit immunitaire)
7. Cancer ou hémopathie en cours d'évolution

### 4.2.4. Déroulement de la recherche

En pratique, lors de leur consultation en ORL, si le patient accepte d'être inclus après information, les patients ont un examen clinique complet et reçoivent la prescription des examens complémentaires nécessaires si ces derniers n'ont pas déjà été réalisés récemment (<6 mois). Les données sont colligées dans une base de données anonymisée.

Le patient répond à un questionnaire permettant d'évaluer les symptômes cardinaux de la PNS à partir d'une échelle visuelle analogique de 0 à 10. Il a ensuite un examen clinique ORL standard (otoscopie, puis rhinoscopie au spéculum puis endoscopie nasale) afin de faire un bilan anatomique nasal (durée 5 minutes).

Il est remis un questionnaire au patient pour connaître l'impact sur sa qualité de vie de sa symptomatologie et l'importance de sa gêne nasale (score utilisé en routine et validé dans la littérature, SNOT-22 (**Annexe 3**) ainsi qu'un questionnaire concernant leur asthme s'il existe (score utilisé en routine et validé dans la littérature, ACT, **Annexe 4**). L'importance de l'atteinte endoscopique sera évaluée à partir du score endoscopique de polypes (**Figure 3**) et l'importance de l'atteinte radiologique récupérée directement à partir des résultats du TDM ou du CBCT en utilisant le score de Lund-MacKay (**Figure 4**).



**Figure 3. Score de polypes nasaux endoscopiques**

*Source : (Meltzer et al. 2006)*

RADIOLOGICAL GRADING	R	L
<i>Sinus systems (0-2)</i>		
Maxillary:		
Anterior ethmoids:		
Posterior ethmoids:		
Sphenoid:		
Frontal:		
OMC (0 or 2):		
<b>TOTAL:</b>		

**Figure 4. Score scanographique de Lund-Mackay**

*Source : (Lund et Mackay 1993a)*

Le temps estimé pour répondre à ces questionnaires et pour évaluer l'atteinte endoscopique et radiologique est de 10 minutes supplémentaires. Une prise de sang est réalisée ou prescrite (faisant partie du bilan de routine initial) pour évaluer la formule sanguine (à la recherche d'une hyperéosinophilie sanguine) et le taux d'IgE (IgE sériques et totales). Nous renouvelons l'évaluation lors du suivi des patients, à nouveau à l'aide d'un questionnaire, et par un interrogatoire et un examen physique, 3 mois après la dernière consultation. Aucun examen ou questionnaire supplémentaire au bilan habituel n'est réalisé pour cette étude. Le circuit des données, le respect de la confidentialité et leur archivage respecteront toutes les normes en vigueur selon le comité national de l'information et des libertés (CNIL).

### 4.3. Gestion des données

Le détail des données recueillies apparaît dans le **Tableau 3**.

<p><b><u>VISITE 1 : Jour 0 (J0)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Examen clinique ORL standard pour bilan anatomique nasal</li> <li>- Evaluation des examens radiologiques déjà réalisés ou prescription d'un examen des sinus (TDM ou CBCT).</li> <li>- Prise de sang : NFS, IgE totales</li> </ul>	<p><b><u>Terrain :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Age, Sexe, Antécédents (Atopie, asthme, SAS, RGO, otite séromuqueuse)</li> <li>- Intolérance : aspirine, sulfites</li> <li>- Antécédents de chirurgie sinusienne</li> </ul> <p><b><u>Symptômes :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- EVA clinique intensité des symptômes : obstruction nasale, rhinorrhée antérieure, rhinorrhée postérieure, douleurs sinusiennes, troubles de l'odorat, troubles du sommeil</li> <li>- EVA clinique fréquence des 6 symptômes cardinaux cités précédemment.</li> <li>- Troubles du goût</li> </ul> <p><b><u>Examen physique :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Otoscopie (+/- audiométrie-tympantométrie si suspicion d'otite séromuqueuse)</li> <li>- Score de Score de polypes nasals endoscopiques (<b>Figure 3</b>)</li> <li>- Score SNOT-22 (<b>Annexe 3</b>)</li> </ul> <p><b><u>Examen radiologique :</u></b></p> <p>Score de Lund McKay (<b>Figure 4</b>) si scanner déjà fait</p> <p><b><u>Biologie :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Eosinophilie sanguine</li> <li>- IgE totales</li> </ul> <p><b><u>Si patient asthmatique :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sévérité de l'asthme en 4 stades</li> <li>- Traitements pris pour l'asthme</li> <li>- Nombre d'exacerbations</li> <li>- Nombres d'hospitalisations en raison d'exacerbations</li> <li>+ Score ACT (<b>Annexe 4</b>)</li> </ul> <p><b><u>Traitements réalisés pour la PNS :</u></b></p> <p>Traitement local et par voie générale</p> <p>Evaluation de la consommation annuelle de corticoïdes oraux (mg/an)</p>
<p><b><u>VISITE 2 : J90</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Examen clinique ORL standard pour bilan anatomique nasal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mêmes données que lors de la visite 1 réalisée à J0</li> <li>+ Score de Lund McKay si Scanner fait entre la V1 et le V2.</li> </ul>

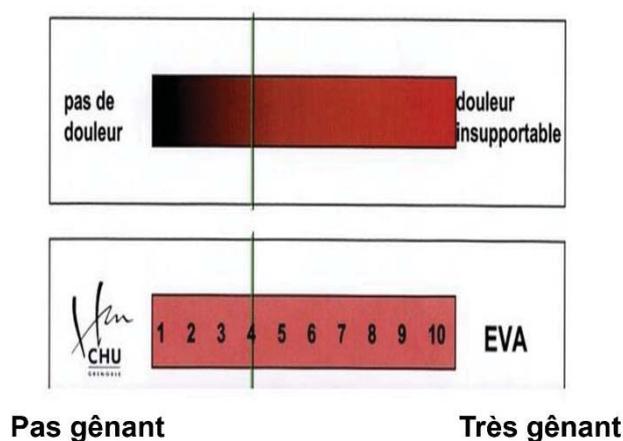
**Tableau 3. Données recueillies lors de la première et deuxième visite dans l'étude PSI**

Le CRF utilisé pour la création d'un e-CRF est fourni en annexe ainsi que la note d'information remise au patient lors de la première visite correspondant à l'inclusion (**Annexe 5&6**). Lors de la première consultation, l'ensemble des indicateurs cliniques et paracliniques permettra d'implémenter le modèle statistique pour établir le score de sévérité de la maladie (Objectif principal).

- L'examen clinique ORL initial comprend une rhinoscopie antérieure et une nasofibroscopie au tube souple afin d'évaluer la présence de polypes et l'importance de l'obstacle nasal.

- Score de polypes nasals endoscopiques (**Figure 3**)

- Echelle visuelle analogique (EVA) pour mesurer : obstruction nasale, rhinorrhée antérieure, rhinorrhée postérieure, troubles de l'odorat, douleurs sinusiennes pour chaque patient (**Figure 5**). L'intensité des 6 symptômes cardinaux de la PNS peut être évaluée par une échelle visuelle analogique (EVA) se présentant sous la forme d'une réglette à deux faces sur laquelle se déplace un curseur. Une face est destinée au patient et l'autre est utilisée par le médecin.



**Figure 5. Echelle visuelle analogique**

*Le côté non numérique est présenté au patient. Le praticien déduit ainsi la gêne sur une échelle de 0 à 10 allant de pas gênant à très gênant.*

- Le patient remplit un score de qualité de vie en lien avec la pathologie nasale validé dans la littérature et validé en français, le score SNOT-22 (**Annexe 3**)

- Interprétation des images radiologiques selon le score de Lund McKay si le patient est venu avec un scanner des sinus déjà réalisé (**Figure 4**). Ce score permet d'identifier l'importance de l'atteinte sinusienne. Chaque compartiment sinusien est évalué séparément sur une échelle de 0 à 2 (0, aucun comblement ; 1, comblement partiel ; 2, comblement total) (Lund et Mackay 1993b; Lund et Kennedy 1997).

Trois mois après la première consultation, à l'occasion de la consultation de suivi classique de routine, l'ensemble des indicateurs sera de nouveau mesuré (à l'exclusion du scanner et de la biologie) pour évaluer l'impact sur les symptômes, leur fréquence, leur intensité, mais aussi les modifications endoscopiques.

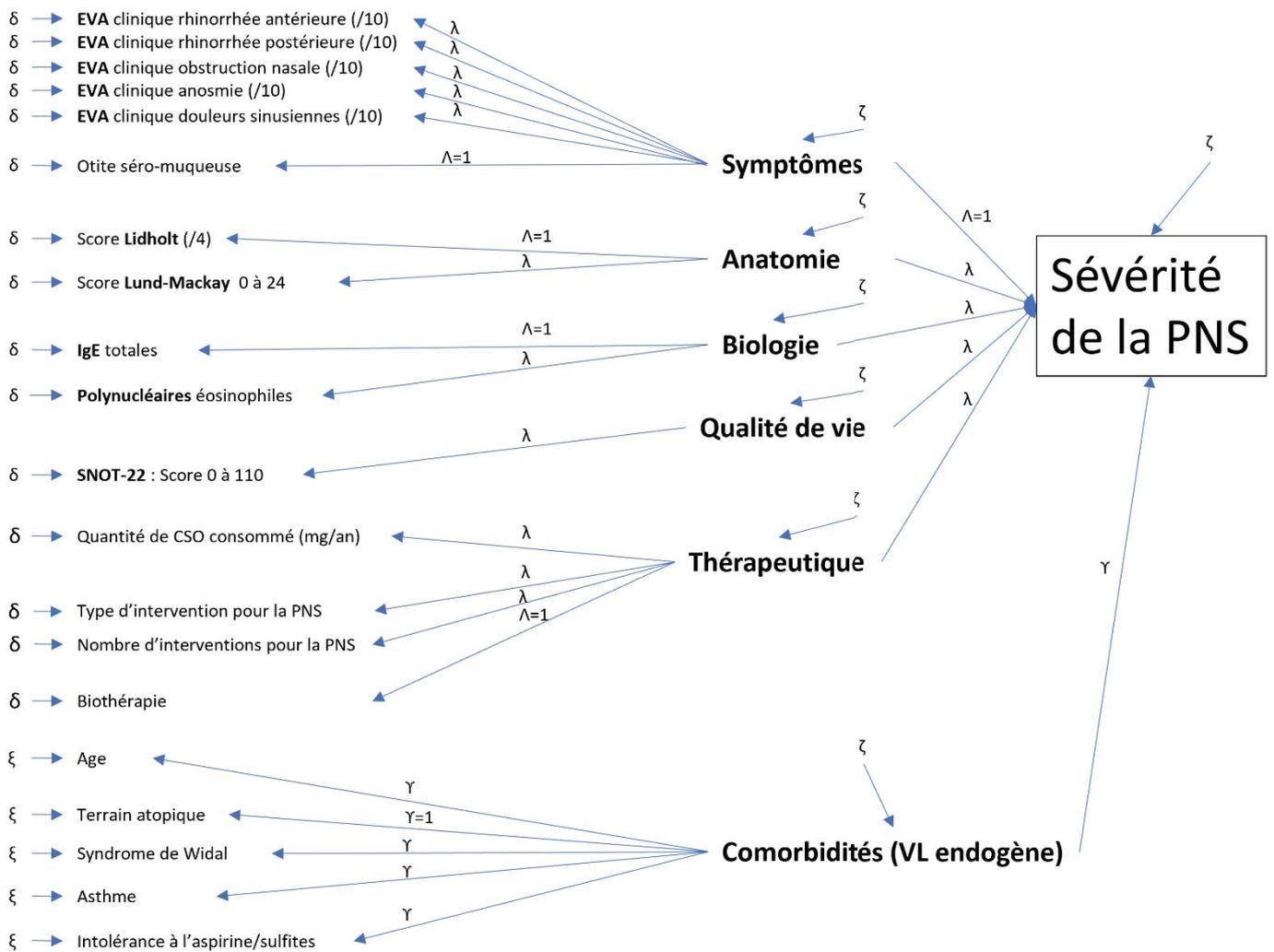
## 4.4. Taille de la population étudiée et aspects statistiques

### 4.4.1. Taille de la population étudiée

L'étude est divisée en deux parties, la phase de construction du score (à partir du training set) et la phase de validation du score (à partir du testing set). D'après les recommandations COSMIN (Mokkink *et al.* 2010; Terwee *et al.* 2012), pour la construction du modèle, le nombre de sujets total doit être supérieur à 10 fois le nombre de paramètres prévus pour l'analyse factorielle confirmatoire (AFC) (47 paramètres dans le modèle) donc au minimum 470. Il est nécessaire de confirmer les résultats du modèle construit (training set) sur des données indépendantes (testing set), un effectif de 100 sujets étant suffisant pour cette seconde partie. Il faut rajouter 10% de perdus de vue donc le nombre de sujets nécessaires total a été calculé à 650. Chaque semaine, 1 à 2 patients sont vus en consultation pour une PNS au minimum (5 patients par mois) pour chaque centre, donc 40 patients par mois, soit environ 360 patients en 12 mois et 720 patients en 24 mois.

### 4.4.2. Choix des indicateurs

Pour pouvoir utiliser le score facilement, les indicateurs de mesures choisis étaient uniquement des données recueillies en routine lors d'une consultation d'ORL pour un patient atteint d'une PNS et très largement décrits dans la littérature (W. J. Fokkens *et al.* 2020). A partir des indicateurs mesurables, des catégories ont été réalisées pour pouvoir définir des VL intermédiaires qui sont toutes, de façon plus ou moins directes le reflet de la sévérité de la PNS. Ainsi les symptômes cardinaux de la PNS étaient regroupés au sein de la VL Symptômes (Bonfils *et al.* 2016) ; le volume des polypes évalués en endoscopie et sur le scanner dans la VL Anatomie ; l'éosinophilie sanguine et les IgE totales dans la VL Biologie ; le SNOT-22 (choisi car largement utilisé dans la littérature scientifique) dans la VL Qualité de vie ; la dose cumulée annuelle de cortisone, le nombre et le type d'interventions, ainsi que l'introduction d'une biothérapie était dans la VL Thérapeutique ; et, l'âge, l'asthme, l'intolérance aux sulfites, l'atopie et/ou le syndrome de Vidal dans la VL Comorbidités. Ces différentes VL étant toutes le reflet plus ou moins direct de la sévérité de la PNS. Le détail des coefficients à estimer en fonction de chacune des indicatrices et VL du modèle est dans la **Figure 6**.



**Figure 6. Modèle à équations structurelles pour l'estimation de la sévérité de la PNS (modèle PSI)**

Les indicateurs de mesures sont représentés à gauche avec leur coefficient ( $\delta$  pour les variables exogènes et  $\epsilon$  pour les variables endogènes), puis les VL sont définies, toutes reliées à leurs indicateurs par un coefficient, appelés loading factor ( $\lambda$ ). Les coefficients  $\lambda$  représentent la corrélation entre la VL commune aux indicateurs et chaque indicateur. Pour chaque VL, un des coefficients est défini arbitrairement comme une constante ( $\lambda=1$ ). Chacune des VL est elle-même associée à un coefficient  $\zeta$ . Puis les VL sont reliés à la sévérité de la PNS à l'aide d'un nouveau coefficient  $\lambda$ , dont un sera arbitrairement fixé à 1. Pour les VL exogènes, le coefficient entre les indicateurs et la VL sont des coefficients qui seront identifiés par la lettre grec  $\gamma$ .

Ici, on se place dans le cadre d'une AFC, c'est-à-dire qu'on considère que les réponses aux items sont le reflet d'un phénomène latent, et que les réponses intègrent des erreurs (la personne n'a pas donné, pour différentes raisons, exactement la bonne réponse). On intègre donc dans le modèle l'erreur de mesure, c'est l'opposé d'un modèle constructiviste. On pourrait simplifier en disant qu'un modèle à équations structurelles est une généralisation de AFC avec une structure de relations causales entre les VLs.

### 4.4.3. Analyses statistiques

Le modèle à VL est un modèle statistique associant un modèle de mesure et un modèle structurel. Le modèle de mesure correspond au modèle reliant les indicateurs aux VL qu'il renseigne (sévérité clinique, endoscopique, biologique et scanographique). Le modèle structurel correspond aux liens entre les différentes VL retenues, qui renseignent toutes sur la VL endogène, ici, la sévérité de la PNS (score PSI). Le modèle envisagé (score PSI) était représenté sur la **Figure 6**. Ce modèle hypothétique pourra être adapté une fois les données recueillies et les premières analyses descriptives réalisées. Un modèle à équations structurelles est construit par définition avec des VL, mais qu'on ne connaît pas. Or, il faut bien définir ces VL relativement à des indicateurs. Pour calibrer le modèle, plusieurs méthodes existent, dont la plus simple consiste à fixer le loading factor ( $\lambda$ ) d'un indicateur pour chaque VL à 1, en général le premier item de la VL. Les autres coefficients seront déduits à partir de cette constante.

Concernant le modèle PSI, le nombre de paramètres à estimer est de 7 variances pour les VL (symptômes, anatomie, biologie, qualité de vie, thérapeutique, comorbidités et sévérité) ; 20 variances résiduelles associées aux indicateurs de mesures et 20 loading factors. Le nombre total de paramètres à estimer est donc de 47. La quantité d'informations dans le modèle est égal à la somme des covariances et des variances résiduelles, le modèle est donc identifiable.

La construction du score de sévérité sera obtenue à terme à partir d'un modèle à équations structurelles. Plusieurs modèles seront construits sur le *training set* en faisant varier le nombre de VL et les relations entre les indicateurs de mesures et les VL. Le modèle proposé dans la **Figure 6** sera adapté en fonction des résultats obtenus à partir de ces premières analyses. L'adéquation du modèle retenu sera vérifiée sur le testing set. Les analyses statistiques seront réalisées avec le logiciel R version 4.0.4 (2021-02-15) en utilisant le package lavaan pour la construction de modèles à équations structurelles.

## 5. Accord du comité scientifique et éthique



### **Avis du Comité d’Ethique Local du Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil (CHIC)**

\*\*\*

Je soussigné, Professeur Jean-Marc Baleyte, Président du Comité d’Ethique Local du CHIC, atteste que l’étude « Développement d’un score d’évaluation de la sévérité dans la polypose nasosinusienne (Score PSI) », étude non interventionnelle (hors Loi Jardé),  
Présentée par le Docteur Maxime Fieux  
Examinée lors de la session du 21.05.2021  
Ne contrevient d’aucune façon au respect des valeurs, du soin et de la santé et respecte les exigences éthiques d’une étude observationnelle.

Avis n° 2021-05-06

Fait à Créteil,  
Le 26.05.2021

Pour faire valoir et servir ce que de droit.

Jean-Marc BALEYTE  
Professeur de pédopsychiatrie  
Université Paris Est Créteil  
Chef du Service Universitaire de Psychiatrie de l’enfant et de l’adolescent, 5ème secteur du Val de Marne  
Directeur de la Maison des Adolescents du Val de Marne



## 6. Synthèse et perspectives

La participation des patients est de 3 mois au total. Une première consultation permet d'évaluer la sévérité de la maladie à partir des examens réalisés en routine et de recueillir les éléments cliniques, biologiques et radiologiques qui permettront de construire ultérieurement le nouveau score de sévérité, puis de mettre en place le traitement le plus adapté selon les critères actuellement en vigueur. Lors de la seconde visite à 3 mois, tous les examens réalisés pourront être recueillis et le patient pourra être réévalué cliniquement pour apprécier le contrôle de la maladie. L'ensemble des consultations, examens complémentaires et traitements mis en place font partie des examens de routine dans la prise en charge et le suivi de la PNS.

Ce projet permettra de créer un score de sévérité de la PNS à partir d'un modèle statistique robuste, et secondairement partageable par la majorité des ORL. En effet, l'étude des corrélations permet de comprendre les associations entre les variables, mais l'étude de corrélations univariées entre les variables mesurées dans la plupart des travaux de recherche ne donne qu'un aperçu limité de leurs relations. La modélisation à équations structurelles est une procédure statistique plus poussée qui consiste à combiner les techniques d'analyse habituelles et des régressions multivariées pour construire un modèle causal des relations entre les variables qu'elles soient mesurables ou latentes. Ce score qui n'existe pas actuellement est indispensable pour définir les indications des traitements, en particulier des biothérapies qui sont depuis peu prescriptibles par les ORL avec des indications restreintes aux formes sévères et non contrôlées de PNS. Une fois ce score créé, il devra être testé à grande échelle sur le plan national (intention de PHRC 2025) pour être, nous l'espérons, adopté comme un standard de l'évaluation de la PNS, et proposé après traduction à une validation internationale.

A ce jour 417 patients ont pu être inclus dans l'étude et les analyses descriptives préliminaires ont débuté mais le testing set n'est pas encore suffisant pour que le modèle puisse être construit.



## Axe 2 :

Caractérisation *in vitro* de l'effet des cytokines et d'une biothérapie sur l'épithélium nasal humain



# 1. Introduction

La PNS est une maladie multifactorielle inflammatoire chronique (Watelet, Dogne, et Mullier 2015). Des facteurs héréditaires, anatomiques, allergéniques, et infectieux (bactériens et viraux) ont été étudiés comme acteurs potentiels indépendants ou intriqués à l'origine de la PNS (W. J. Fokkens *et al.* 2020; Mortuaire *et al.* 2018; 2015). La théorie du microbiome et l'implication virale ont été décevantes (Akdis *et al.* 2013) alors que l'hypothèse d'une dysrégulation épithéliale (Herard *et al.* 1996) qui rendrait l'épithélium plus sensible aux agressions environnementales empêchant la restauration de la fonction de barrière semble plus robuste (Coste *et al.* 2000; Coste, Rateau, Bernaudin, *et al.* 1996; Coste, Wang, *et al.* 1996). Selon cette hypothèse, quel que soit le facteur initial d'agression capable de léser la barrière épithéliale, 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 des éléments importants du remodelage épithélial anormal (Danielsen *et al.* 2006). L'immunité T2 a longtemps été considérée comme un simple mécanisme de contre-régulation contrôlant l'immunité T1 (A. K. Abbas, Murphy, et Sher 1996). Aujourd'hui, les différents rôles des cytokines T2 dans les maladies inflammatoires chroniques sont mieux identifiés (Wynn 2015). Les mécanismes spécifiques régulant l'implication des différentes cytokines et la participation des différents types de cellules (EO, mastocytes, basophiles, lymphocytes) restent mal définis, tout comme la transformation de la réponse immunitaire T2 régénératrice en un processus inflammatoire chronique hyperprolifératif (Wynn et Vannella 2016). De nombreuses cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-12, IFN $\gamma$ , IL-13, IL-17A et IL-22) semblent impliquées dans l'inflammation T2 (Bartier, Coste, et Béquignon 2020; Carsuzaa *et al.* 2021) (voir chapitre 2.1.2). Le dupilumab, un AcM entièrement humain qui se lie à l'IL-4R $\alpha$ , le récepteur commun de l'IL-4 et de l'IL-13, bloquant ainsi la signalisation des deux cytokines, s'est révélé efficace dans de nombreuses maladies T2 pour lesquelles il est approuvé comme traitement de 2<sup>ème</sup> ligne (l'asthme, la dermatite atopique (DA) ou la PNS) (Gandhi, Pirozzi, et Graham 2017; Le Floc'h *et al.* 2020; Wytys J. Fokkens *et al.* 2019; Reddel *et al.* 2015). Son mécanisme d'action et ses indications thérapeutiques ainsi que celles des autres biothérapies de l'inflammation T2 seront détaillés dans un chapitre dédié (voir chapitre 2.2.).

De nombreux effets de l'IL-6 sur les CENH sont connus (Bequignon *et al.* 2020), mais ses effets sur les protéines de jonctions serrées (JS) et sur la résistance électrique transépithéliale (RETE) n'ont jamais été décrits. Au sein de cette famille de cytokines, il existe d'autres cytokines pléiotropiques, comme l'OSM, ayant fait la preuve de leur action anti-inflammatoire sur la fibrose induite par l'IL-4 (Carsuzaa *et al.* 2022) mais pour lesquelles aucune analyse épithéliale n'a été réalisée sur des CENH. Ensuite, les effets de l'IL-4 et de l'IL-13, bien décrits *in vitro* (Wise *et al.* 2014; 2013), n'ont jamais été étudiés en présence du dupilumab. Enfin, bien que l'efficacité clinique du dupilumab soit clairement prouvée en 2023 (Claus Bachert *et al.* 2016), ses effets à l'échelle cellulaire et en particulier sur la cellule épithéliale sont méconnus.

L'objectif était de caractériser *in vitro* les dysrégulations épithéliales induites par l'IL-4, l'IL-13 et le dupilumab en l'absence et en présence de sa cible et caractériser les effets de l'OSM sur l'épithélium nasal humain. Dans un premier travail, nous avons analysé l'expression de l'IL-6, de l'OSM et des protéines de JS dans les polypes. Ensuite, sur les CENH à l'IAL *in vitro*, nous avons analysé i) le modèle d'expression des récepteurs IL-6 et OSM, ii) l'effet de l'IL-6 et de l'OSM sur l'expression des protéines de JS et la RETE, et iii) l'effet de l'OSM sur l'efficacité du battement ciliaire et la capacité de réparation après une blessure. Dans un second travail, nous avons analysé sur des CENH à l'IAL, i) le modèle d'expression de l'IL-4R $\alpha$ ; ii) l'effet de l'IL-4 et de l'IL-13 sur la RETE, l'expression des JS, l'efficacité du battement ciliaire et la capacité de réparation après une blessure; et iii) l'effet du dupilumab sur les mêmes fonctions épithéliales en présence de sa cible principale, l'IL-4.

## 2. Rappels : Inflammation T2 et Biothérapies

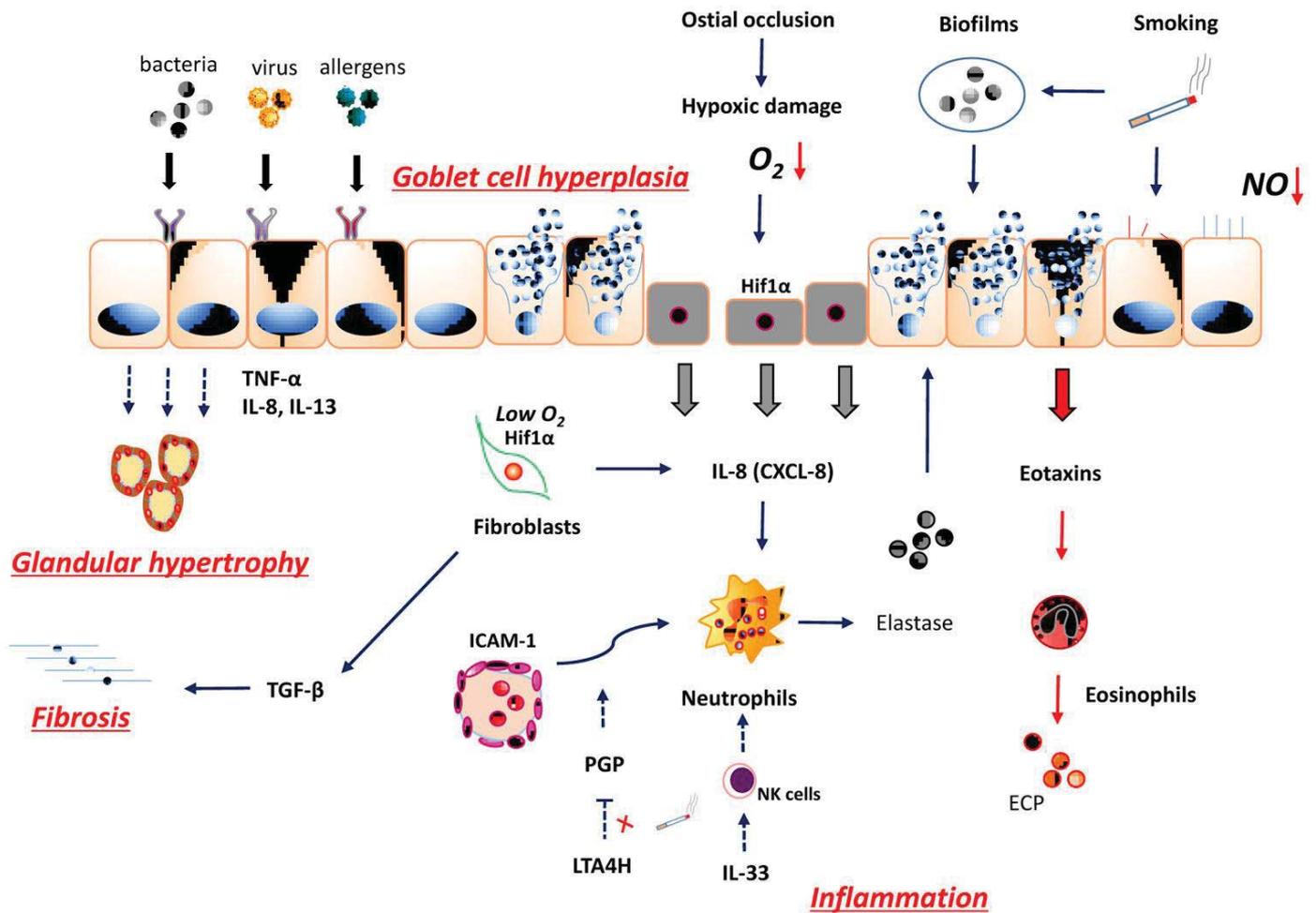
Nous aborderons dans une première section, les cellules impliquées dans l'inflammation T2 et les moyens d'études des fonctions épithéliales *in vitro*, puis les cytokines impliquées dans la genèse de la PNS seront détaillées, et enfin, nous ferons une synthèse des mécanismes d'actions des biothérapies ciblant les principales cytokines d'intérêt dans la PNS. Les deux études qui font l'objet de l'axe 2 de ce manuscrit mettent la cellule épithéliale nasale humaine au centre de la dysrégulation conduisant au développement de la PNS et se concentre spécifiquement sur les effets de l'IL-6, de l'OSM, de l'IL-4, de l'IL-13, et des effets d'une biothérapie, le dupilumab. Ainsi, dans un souci d'exhaustivité et de synthèse, les autres cellules et cytokines impliquées dans l'inflammation T2 seront rapidement évoquées en insistant sur leur rôle dans la PNS.

### 2.1 Inflammation de type 2 : cellules et cytokines

#### 2.1.1. Les cellules impliquées

Bien que les interactions entre l'hôte et l'environnement soient complexes et commencent très tôt dans la vie, peut-être *in utero*, il est important de garder à l'esprit que la PNS est principalement une maladie qui se manifeste à l'âge adulte. Cela suggère que la durée, l'intensité et la chronologie de l'exposition, y compris les événements intercurrents tels qu'une infection virale, peuvent être des éléments clés de la pathogénie de la PNS (Laidlaw *et al.* 2021). En situation physiologique, l'épithélium agit comme une barrière relative, modulant ses réponses selon la stimulation environnementale. En cas d'agression par un agent pathogène, la réponse immunitaire de type 1, 2 ou 3, simple ou combinée, sera initiée. Cette activation de l'immunité sera à l'origine d'une production importante d'alarmines et de cytokines, mais aussi d'une réponse cellulaire innée et de réponses T helper (Th) conçues pour éliminer l'agent pathogène identifié (Halim *et al.* 2016).

Les principales fonctions du système immunitaire inné comprennent la phagocytose, le recrutement de cellules immunitaires sur les sites d'infection, l'activation du système immunitaire adaptatif par la présentation d'antigènes (Ags) permettant d'identifier et d'éliminer les bactéries, les complexes Ac-Ag, les cellules mortes, ainsi que les substances étrangères. L'inflammation T2 se caractérise par une réponse immunitaire impliquant les cellules épithéliales et les EO avant tout. D'autres types cellulaires jouent également un rôle, les polynucléaires neutrophiles (PNN), les lymphocytes T2 (LT2), les cellules lymphoïdes de l'immunité T2 (CLI2), les lymphocytes natural killer (LNK), les mastocytes, et les macrophages (C. Bachert *et al.* 1998; 1997; Nakagome et Nagata 2018; W. J. Fokkens *et al.* 2020). Les différentes cellules et molécules impliquées dans la pathogénie de la PNS sont représentées dans la **Figure 7**. D'autres cellules sont impliquées mais leur rôle est moins précisément défini, notamment les basophiles et les plaquettes, elles ne seront que rapidement décrites.



**Figure 7. Schéma des différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la PNS**

Quelle que soit l'agression épithéliale initiale, la réponse immunitaire de l'organisme, si non régulée, peut conduire à une chronicisation de l'inflammation impliquée dans la pathogénie de la PNS. La cellule épithéliale semble jouer un rôle central. Les lignes continues correspondent aux mécanismes probables, les lignes pointillées aux mécanismes possibles.

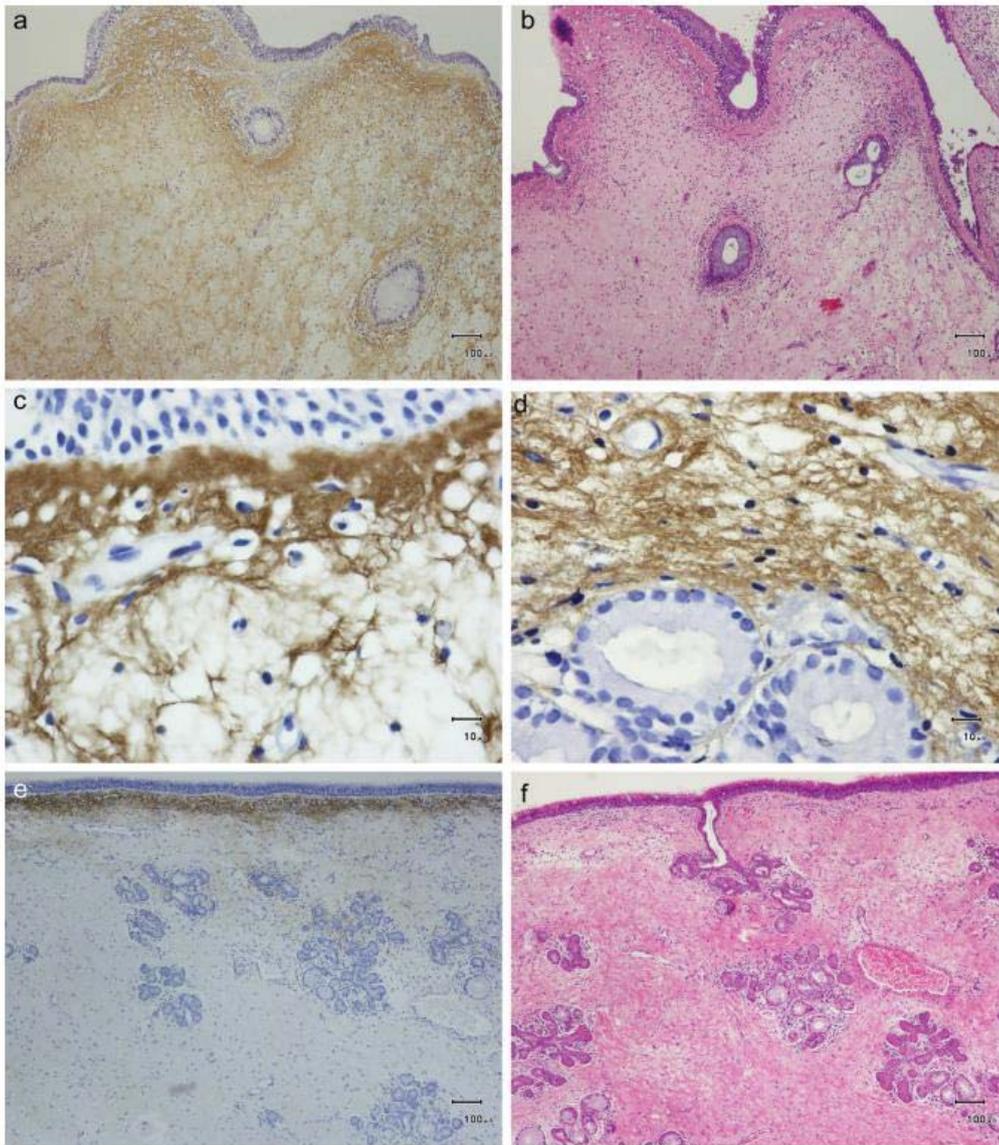
Source : (Seong Ho Cho, Kim, et Gevaert 2016)

### a. Les cellules épithéliales

L'épithélium des voies aériennes respiratoires supérieures est un épithélium de type respiratoire pseudostratifié prismatique et cilié, séparé du chorion sous-jacent par une membrane basale. Il est composé de 3 principaux types cellulaires : les cellules basales, les cellules à mucus, et les cellules ciliées. Les cellules basales sont des cellules rondes de petite taille, amarrées à la membrane basale, permettant l'ancrage des autres cellules (Evans *et al.* 1993). Elles seraient capables de proliférer et de se différencier en cellules à mucus et en cellules ciliées dans les régions lésées (D. S. Lazard *et al.* 2009). Les cellules à mucus sont spécialisées dans la sécrétion du mucus qui piège les aérocontaminants et possède un rôle antibactérien (Chowdhury *et al.* 2019). Les cellules ciliées sont des cellules hautement différenciées qui portent à leur pôle apical des extensions cytoplasmiques spécialisées, les cils. Conjointement avec les cellules à mucus, elles participent à la clairance mucociliaire (CMC) grâce au battement des cils (Chapelin *et al.* 1996; D. S. Lazard *et al.* 2009). Les cellules épithéliales nasales humaines (CENH) favorisent l'adhésion des cellules inflammatoires à l'épithélium en exprimant des molécules d'adhésions (Papon *et al.* 2002).

Les CENH jouent aussi un rôle important dans la réponse immunitaire en libérant des cytokines et des chimiokines en réponse à la stimulation par les allergènes, les virus, les champignons ou les bactéries. Les cytokines libérées par les cellules épithéliales seront détaillées dans un chapitre dédié (chapitre 2.1.2). Les CENH peuvent également se dédifférencier par métaplasie malpighienne ou transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), décrite habituellement comme une modulation rapide et normalement réversible du phénotype épithélial vers des cellules mésenchymateuses (Toppila-Salmi *et al.* 2015). Les CENH qui subissent une TEM perdent la polarité cellule-cellule et l'adhésion intercellulaire pour devenir migratrices et régulent généralement à la baisse les protéines de JS (telles que la E-cadhérine) tout en acquérant des caractéristiques mésenchymateuses telles que l'actine musculaire lisse  $\alpha$ , la vimentine, les métalloprotéinases matricielles (MMP) et certains facteurs de transcription. Par ces caractéristiques, les CENH constituent la première ligne de défense de l'appareil respiratoire.

D'autres protéines que les cytokines semblent impliquées dans la pathogénie de la PNS, mais elles n'ont pas fait l'objet d'études dans le cadre de ce manuscrit et seront uniquement mentionnées. Il s'agit des MMP, dont les niveaux d'expression sont élevés au sein des polypes, notamment pour la MMP-1, -2, -7 ou -9 (Malinsky *et al.* 2013; Homma *et al.* 2017; Diane S. Lazard *et al.* 2007). Enfin, une autre protéine semble jouer un rôle important, il s'agit de la périostine (**Figure 8**) qui pourrait être utile pour détecter les phénotypes T2 parmi les patients atteints de PNS (Ishida *et al.* 2012; W. J. Fokkens *et al.* 2020). Kim *et al.* ont suggéré que la source cellulaire principale de périostine dans la PNS était les mastocytes (D. W. Kim *et al.* 2017).



### Figure 8. Profil d'expression de la périostine dans l'épithélium nasal

Deux schémas d'expression de la périostine ont été identifiés sur le plan histologique, le type « diffus » (a-d), dans lequel la périostine est exprimée dans toute la lamina propria à partir de la membrane basale, et le type « superficiel » (e-f), dans lequel la protéine n'est détectée que dans les couches sous-épithéliales situées entre la membrane basale et le tissu glandulaire. (a) Immunohistochimie de la périostine dans un champ de faible puissance (40x), (b) Coloration Hématoxyline et Éosine (40x), (c) IHC de la périostine dans la partie sous-épithéliale d'un champ de forte puissance (400x), et (d) dans la sous-muqueuse d'un champ de forte puissance (400x). France IHC de la périostine dans le champ de faible puissance (40x) et (f) Coloration H&E dans le champ de faible puissance (40x).

Source : (Shiono et al. 2015)

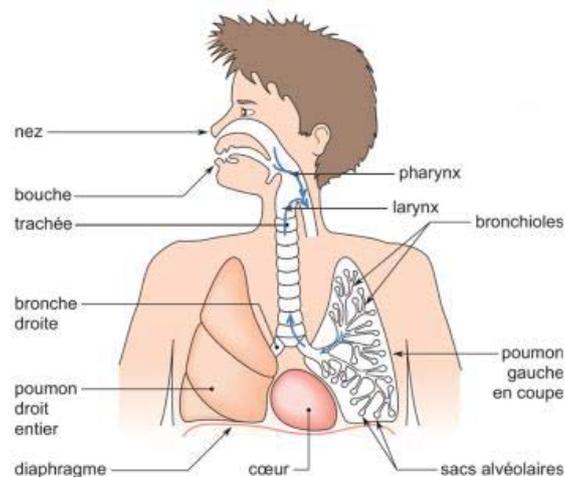
### **La barrière épithéliale**

L'épithélium des voies aériennes supérieures est une barrière physique entre le milieu extérieur et les cellules de l'espace sous-épithélial situé en dessous (Kojima *et al.* 2013; N. Zhang *et al.* 2016). La fonction de barrière de l'épithélium est assurée par les jonctions intercellulaires, en particulier les JS. Les JS apicales, les jonctions d'adhérence sous-jacentes, les jonctions lacunaires et les desmosomes forment des complexes multiprotéiques qui, par le contact cellule-cellule, contribuent à établir la polarité cellulaire, à former une barrière et à réguler le flux paracellulaire d'électrolytes et de macromolécules (Toppila-Salmi *et al.* 2015). Les JS, situées au niveau apical de la cellule, sont reliées au cytosquelette d'actine (S.-N. Lee *et al.* 2019). L'expression des JS peut être modulée par différents aérocontaminants, tels que les allergènes inhalés, les infections microbiennes ou virales, certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL4, IL-13), l'hypoxie ou la carence en zinc (Jian Jiao, Wang, et Zhang 2019; Herard *et al.* 1996).

Plusieurs gènes et molécules (SPINK5, S100A7, S100A8/9, PCDH1, NDRG1, SPRR et p63) sont impliqués dans la modulation de la fonction de barrière épithéliale dans la PNS (Jian Jiao, Wang, et Zhang 2019). La protéine 1 de la membrane de l'épithélium (EMP1) est une protéine de JS médiatrice de la prolifération cellulaire et il a été démontré que son expression génétique et protéique était plus faible dans l'épithélium des polypes nasaux que dans la muqueuse nasale de patients contrôles (X. M. Yu *et al.* 2013). Soyka *et al.* ont mis en évidence une diminution de la RETE au sein de biopsies de patients atteints de PNS ainsi qu'une diminution des protéines de JS (Soyka *et al.* 2012). Jiao *et al.* ont mis en évidence une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale nasosinusienne chez les patients atteints de PNS (diminution de la RETE) et ont identifié le TGFβ1 comme jouant un rôle important dans cette altération (Jian Jiao *et al.* 2018). Il a également été démontré que l'exposition aux cytokines pro-inflammatoires IL-4, IL-13 et IFNγ, qui sont élevées dans la PNS, perturbe l'intégrité épithéliale et réduit la RETE au sein des CENH cultivées en IAL (Soyka *et al.* 2012; Wise *et al.* 2014). Li *et al.* ont montré que l'expression de ZO-1, de claudine-1, de desmogléine (DSG)1 et de DSG2 dans le groupe de patients atteints de PNS et l'expression de claudine-1, de DSG1 et de DSG2 dans le groupe de patients atteints de RSC sans polype étaient significativement plus faibles que dans le groupe témoin (Y. Li *et al.* 2014). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la barrière épithéliale est plus sensible à l'agression environnementale chez les patients atteints de PNS. Les perturbations épithéliales induites par cet environnement inflammatoire en réponse à un aérocontaminant créent une barrière non étanche à l'origine d'une activation des cellules immunitaires de l'espace sous-épithélial (Jian Jiao *et al.* 2018) renforçant l'hypothèse d'un modèle de dysrégulation épithéliale dans la pathogénie de la PNS (Wynne *et al.* 2019).

### La clairance mucociliaire

La CMC est la première ligne de défense de l'appareil respiratoire et elle repose essentiellement sur 3 composantes : le mucus, les cils et les canaux ioniques (Davis et Lazarowski 2008). Le mucus a la double propriété de piéger les aérocontaminants tout en limitant ou en éradiquant la prolifération microbiologique via un arsenal d'agents antibactériens (Knowles et Boucher 2002). Le battement synchronisé des cils situés à la surface des CENH assure le transport du mucus (John V. Fahy et Dickey 2010). La CMC est bidirectionnelle : descendant au niveau des voies aériennes nasales et montant au niveau des voies aériennes sous-pharyngées (trachée, bronches) (**Figure 9**). Cette épuration permet d'éliminer les particules de plus de 10 µm. Au niveau nasosinusal, elle se fait dans le sens du flux d'air depuis l'entrée de la fosse nasale vers l'entrée des voies aérodigestives supérieures, où les aérocontaminants seront avalés (Ganesan, Comstock, et Sajjan 2013). Les CENH et les CEH bronchiques (CEBH) jouent un rôle fondamental dans ce processus et un battement ciliaire efficace et coordonné est essentiel pour une CMC efficace (Maina, Workman, et Cohen 2018). Enfin, le système de transport ionique au niveau de l'épithélium permet de maintenir l'environnement aqueux adéquat à la surface des voies aériennes. L'altération de la CMC se traduit par une stagnation et/ou une accumulation de mucus, pouvant conduire à des obstructions et à des infections chroniques des voies respiratoires. Pour simplifier, deux cadres nosologiques d'altérations de la CMC peuvent être distingués. Le premier correspond aux altérations du mucus, comme dans le cas de la mucoviscidose où le mucus est trop visqueux (Martiniano *et al.* 2014). Le deuxième correspond aux anomalies des cils (ultrastructure ou battement) regroupées sous le terme de ciliopathies pouvant être soit innées soit acquises (Fliegauf, Benzing, et Omran 2007).



**Figure 9. Représentation schématique du sens de la clairance mucociliaire**

*Au niveau nasosinusal l'épuration ciliaire se fait depuis l'entrée de la fosse nasale vers les voies aérodigestives. A l'inverse, au niveau bronchique l'épuration se fait dans le sens du flux d'air expiratoire.*

*Source : Thèse de Bottier Mathieu (Bottier, Blanchon, et al. 2017; Bottier, Peña Fernández, et al. 2017)*

Les cils, dont la structure a été conservée au cours de l'évolution, sont classés en fonction de leur noyau de cytosquelette appelé axonème : les cils primaires (non mobiles) et les cils mobiles assurant le transport des fluides. Les défauts des cils primaires ont été associés à un nombre croissant de maladies génétiques rares (polykystose rénale, syndrome de Bardet-Biedl, ou encore syndrome de Usher), tandis que les cils mobiles sont impliqués dans la ciliopathie la plus répandue, la dyskinésie ciliaire primaire (DCP) (Storm van's Gravesande et Omran 2005; Bonneau *et al.* 1993). Mais les ciliopathies concernent aussi des pathologies plus courantes comme la BPCO (Yaghi *et al.* 2012) ou les RSC (W. J. Fokkens *et al.* 2020). L'analyse de l'ultrastructure des cils par microscopie électronique à transmission (MET) est une technique réalisée uniquement chez des patients spécifiquement sélectionnés en raison du caractère

très chronophage de l'analyse. De plus, une biopsie des voies respiratoires est nécessaire qui sera ensuite traitée par de multiples étapes séquentielles. Au-delà de l'ultrastructure, c'est l'évaluation de la fréquence des battements ciliaires qui est intéressante, et la vidéomicroscopie à haute vitesse (VMHV) a été développée pour pouvoir caractériser les battements anormaux, initialement dans la DCP (Stannard *et al.* 2004; P. G. Noone *et al.* 2004; Mark A. Chilvers, Rutman, et O'Callaghan 2003) mais aussi dans d'autres pathologies appartenant au cadre nosologique des RSC secondaires.

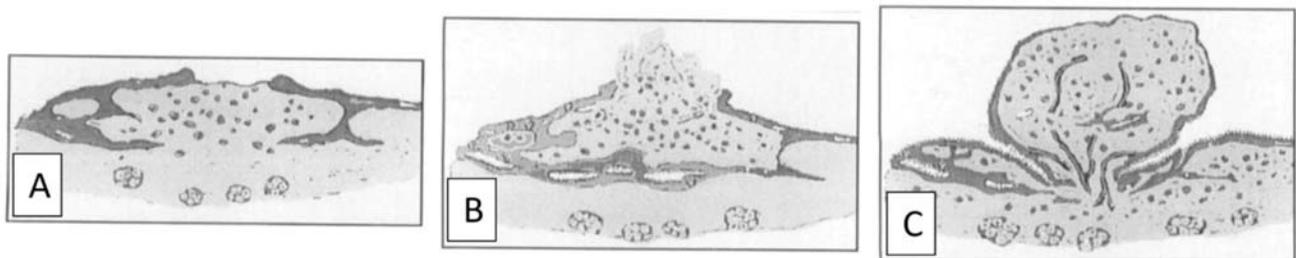
La CMC et les complexes situés au niveau des jonctions apicales entre les CENH sont des éléments essentiels de la pathogénie de la PNS. De nombreuses études ont démontré que la PNS est associée à une diminution de la CMC (Passali *et al.* 1999; Elwany, Hisham, et Gamaee 1998; Hua *et al.* 2013). Le concept de dysrégulation épithéliale à l'origine de la PNS repose en partie sur l'hypothèse d'une CMC insuffisamment efficace conduisant à un temps de contact entre l'aérocontaminant et l'épithélium plus long favorisant la pénétration de ce dernier (Wynne *et al.* 2019). Le battement coordonné des cils transporte le mucus chargé de débris des voies respiratoires vers l'oropharynx (Toppila-Salmi *et al.* 2015). Les défauts génétiques et acquis de la CMC sont associés à une incidence élevée de la PNS (Cutting 2005; Gudis, Zhao, et Cohen 2012). En effet, des anomalies structurales et fonctionnelles dans les cils ont été identifiées chez des patients atteints de PNS (Y. Y. Li *et al.* 2014; J. Jiao *et al.* 2016). Ces anomalies peuvent être secondaires à l'action de cytokines, comme l'IFN $\gamma$  et l'IL-13, qui diminuent la différenciation des CENH ciliées et la fréquence du battement ciliaire (FBC) (J. Jiao *et al.* 2016). Bien que la FBC de base puisse être comparable selon d'autres auteurs entre les patients atteints de PNS et les sujets témoins, elle est émoussée en réponse aux stimuli environnementaux chez les patients atteints de PNS (Hamilos 2014; Zhao *et al.* 2012; B. Chen *et al.* 2006).

Au-delà de l'atteinte des cils, les modifications du mucus participent à l'altération de la CMC. Les cellules ciliées et sécrétoires ne produisent pas les mêmes types de mucines. Or ce sont ces dernières qui sont responsables des propriétés rhéologiques du mucus (élasticité, viscosité, filance, adhérence). En effet, les mucines sont des glycoprotéines filamenteuses de masse moléculaire élevée, capables de former un réseau macromoléculaire par l'établissement de ponts disulfures. Les cils sont recouverts de mucines épithéliales membranaires et de mucopolysaccharides qui excluent le mucus de l'espace périciliaire et favorisent la formation d'une couche de mucus distincte (Toppila-Salmi *et al.* 2015). Les cellules sécrétoires produisent des mucines sécrétées (par opposition aux mucines membranaires), exprimées par le complexe MUC dont les deux principales des voies respiratoires sont codées par les gènes MUC5AC et MUC5B (C.-H. Kim *et al.* 2002; Y. Zhang *et al.* 2019). Comme en témoignent les nombreuses études réalisées sur des cellules épithéliales humaines, les cellules mucosécrétrices coexpriment le plus souvent des mucines sécrétées et membranaires (Fowler, Vinall, et Swallow 2001). Tipirneni *et al.* ont identifié une altération du mucus chez les patients atteints de PNS par rapport aux témoins (Tipirneni *et al.* 2018). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'affaiblissement de la FBC et la réduction de la CMC qui en découle joueraient un rôle important dans la pathogénie des RSC et donc par extension de la PNS également.

Il existe également à la surface des CENH, des récepteurs de reconnaissance de motifs appelés en anglais les *pattern-recognition receptors* (PRR). Ces récepteurs détectent rapidement les formes moléculaires des agents pathogènes, puis induisent une réponse immunitaire. Les récepteurs de type Toll (TLR1-TLR10), les récepteurs NOD, les récepteurs de type RIG et les dectines comptent parmi les PRR les plus connues (Toppila-Salmi *et al.* 2015). La stimulation des TLR exprimés à la surface des CENH (notamment les TLR 2 et 4) conduit à une augmentation de plusieurs cytokines sécrétées selon le TLR stimulé (IL-6, IL-8, IFN $\beta$ , GM-CSF) (Tengroth *et al.* 2014). La PNS pourrait être liée à une augmentation des niveaux d'expression des TLR 2 et 4 (Sun *et al.* 2012; H. Hu et Li 2018; Shimizu *et al.* 2016). TLR 2 serait également à l'origine de l'activation des fibroblastes des polypes nasaux (Tsai *et al.* 2018; S. H. Shin *et al.* 2016; S.-H. Shin *et al.* 2016).

### La réparation épithéliale

La réparation d'une lésion épithéliale implique un processus multi-étapes, commençant par une migration, suivie d'une prolifération et d'une différenciation des CENH qui s'accompagne d'un remodelage de la MEC (Erjefält *et al.* 1995; Rennard 1999). Le mécanisme initial de formation d'un polype pourrait être la perte de la continuité épithéliale à la suite d'une agression suivie d'une dysrégulation de la réparation. Ainsi la rupture épithéliale permettrait une hernie de tissu conjonctif (fibroblastes et cellules inflammatoires) au travers de la brèche épithéliale (**Figure 10**). Secondairement, la prolifération et la migration des cellules épithéliales à partir des berges de la lésion conduiraient à l'épithélialisation de cette hernie conjonctive (Norlander *et al.* 1996). Les auteurs ont cherché à reproduire la formation de polypes. Une effraction mécanique de l'épithélium était réalisée, puis une réaction inflammatoire était induite par inoculation bactérienne (Norlander *et al.* 1996). Des polypes de structure proche de celle rencontrée chez l'Homme étaient ainsi obtenus. Cette hypothèse est confirmée par les modifications de proportions des différents types cellulaires observées dans la PNS. Le nombre de cellules ciliées est en général diminué au profit d'une hyperplasie caliciforme, c'est-à-dire une augmentation des cellules à mucus (Chapelin *et al.* 1996; Coste, Rateau, Roudot-Thoraval, *et al.* 1996).



**Figure 10. Représentation schématique de la séquence de formation des polypes**

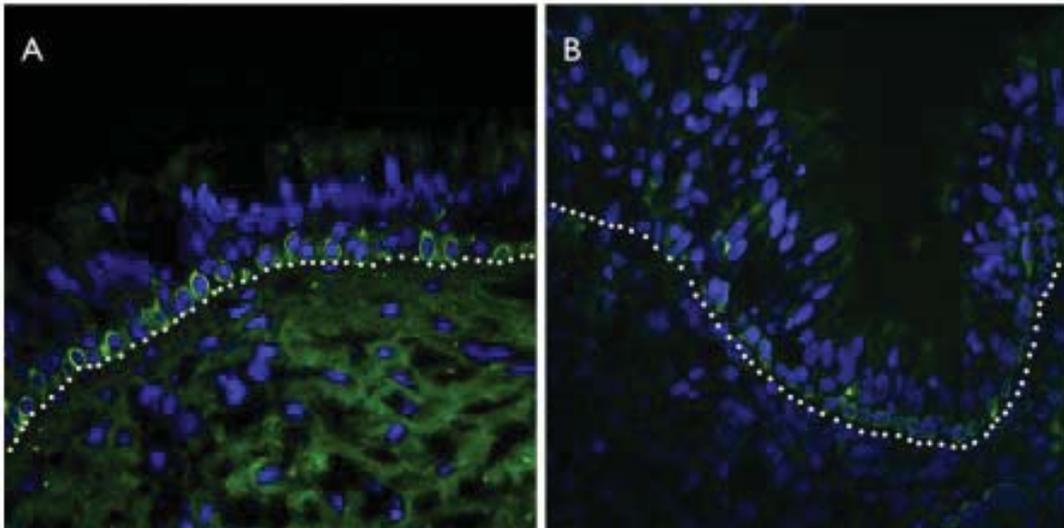
*Au niveau de la rupture épithéliale, la régénération épithéliale débute et envahit la lamina propria (A). De microcavités commencent à se former puis du tissu granulomateux fait issue au travers du défaut épithélial. Les microcavités augmentent progressivement de taille et un épithélium cilié se développe à la périphérie (B). Les microcavités se rompent, créant une communication avec la lumière sinusienne. Un plan de clivage se forme permettant la séparation entre le polype en développement et la muqueuse adjacente (C).*

*Source : (Norlander *et al.* 1996)*

*In vivo*, la formation des polypes a pu être étudiée dans 2 modèles animaux, l'un développé au niveau de l'oreille moyenne de rat (Larsen *et al.* 1992; Cayé-Thomasen *et al.* 1995), l'autre dans le sinus maxillaire de lapin. L'étude de la pathogénie des polypes nasaux chez l'Homme s'est d'abord concentrée sur l'œdème muqueux attribué à différentes causes telles que la dégranulation des mastocytes, la congestion vasculaire (Bumsted *et al.* 1979) et l'altération des mécanismes de transport des ions de l'épithélium (Bernstein et Yankaskas 1994). Mais en réalité, dès 1977, Tos *et al.* évoquaient l'hypothèse d'une dysrégulation épithéliale, reprise ensuite par d'autres auteurs (Tos et Mogensen 1977; Larsen *et al.* 1992; Norlander *et al.* 1996). La PNS résulterait donc de la dysrégulation de réparation tissulaire impliquant non seulement les cellules épithéliales mais aussi des cellules inflammatoires.

### **La communication intercellulaire au sein de l'épithélium**

La communication entre les cellules épithéliales se fait par l'intermédiaire des jonctions communicantes (JC). Ces dernières sont formées par les connexines (**Figure 11**) et facilitent la communication entre les cellules adjacentes assurant ainsi l'homéostasie (R. Kim *et al.* 2016). A partir de biopsies de muqueuses sinusiennes issues de 11 patients avec une PNS et 7 sujets sains, ils ont mis en évidence une augmentation de l'expression génétique et/ou protéique des connexines chez les patients atteints de PNS par rapport aux sujets témoins (R. Kim *et al.* 2016). Néanmoins, l'importance de ces connexines dans la pathogénie de la PNS n'est pas encore clairement établie et elles ne seront pas étudiées dans ce travail sur l'épithélium et les cytokines que j'ai mené.



#### **Figure 11. IHC représentative de la Connexine 26 dans la muqueuse sinusienne**

*La ligne blanche en pointillés délimite l'épithélium et le stroma. Les noyaux ont été colorés au DAPI (bleu) et les connexines marquées en (vert). Coupes histologiques appariées de patients témoins (A) et de patients atteints de PNS (B) avec coloration de la Cx26 (vert) montrant une élévation autour des noyaux des CENH basales.*

*Abréviations : Cx, connexine ; IHC, Immunohistochimie*

*Source : (R. Kim et al. 2016)*

### b. Les éosinophiles (EO)

Les EO existent chez presque tous les vertébrés, représentant jusqu'à 6% des cellules nucléées de la moelle osseuse (Ramirez *et al.* 2018). Il est établi que les EO sécrètent des médiateurs inflammatoires impliqués dans le remodelage tissulaire observé au cours des réponses inflammatoires (Ramirez *et al.* 2018; McBrien et Menzies-Gow 2017) et une augmentation du nombre d'EO est observée dans les tissus et/ou le sang périphérique des patients atteints d'une maladie éosinophilique. Le recrutement nasal des EO à partir de la circulation sanguine nécessite une action complexe entre l'épithélium nasal, les CIL2, les CENH et les cellules immunitaires adaptatives sécrétant des alarmines, des cytokines et des chimiokines spécifiques. Cette réponse immunitaire fait référence à une réponse lymphocytaire T2, souvent considérée comme le principal processus inflammatoire dans la PNS au sein des pays occidentaux.

Le chimiotactisme des EO dans la muqueuse nasale est médié par la production de cytokines contrôlée par des alarmines (dont le TSLP, l'IL-25 et l'IL-33). Ces dernières sont sécrétées par les cellules épithéliales en réponse à une agression. L'expression de molécules d'orientation (*Very Late Antigen* (VLA)-4, CD11a) et de CD44 à la surface des EO est nécessaire pour permettre l'interaction avec leurs ligands exprimés par la muqueuse nasale. Les éotaxines 1, 2 et 3 liées au motif C-C du récepteur 3 de la chimiokine (CCR3) sont également produites par les cellules épithéliales et les fibroblastes au départ et sous stimulation LT2. La sécrétion de RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*) et de prostaglandine D2 (PGD2) est impliquée dans le processus de migration directionnelle des EO dans le compartiment extravasculaire. L'IL-4 et l'IL-13 libérées par les LT2 et les CIL2 contribuent au chimiotactisme des EO. Ces derniers ont une survie prolongée dans la muqueuse nasale car certaines cytokines produites localement ont un effet anti-apoptotique. Les cytokines clés sont l'IL-5, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et l'IL-3 (Rosenberg, Dyer, et Foster 2013). L'IL-5 est essentielle à la différenciation, à la migration vers les tissus, à l'activation et à la survie des EO dans la moelle osseuse (voir chapitre 2.1.2) (C. Pelaia *et al.* 2019; Kung *et al.* 1995).

Après avoir été recrutés au sein des tissus périphériques par la réaction inflammatoire, les EO activés sont à l'origine d'un stress oxydatif (libération de radicaux libres) par le biais de granules cytotoxiques. Ces granules sont des protéines *Major Basic Protein-1* (MBP), *Eosinophil Peroxidase* (EPX), *Eosinophil Cationic Protein* (ECP), et *Eosinophil Derived Neurotoxin* (EDN)) impliquées dans le remodelage des tissus au niveau nasosinusal (Vanderhaegen *et al.* 2022). Ces granules sont capables d'agir longtemps après la mort des EO qui les ont produits (ou libérés lors de leur propre apoptose), et ils sont directement cytotoxiques permettant la digestion des pathogènes extracellulaires, mais agressant aussi les tissus sains. Les EO perturbent l'organisation architecturale de la MEC, favorisent la cytotoxicité cellulaire (par le biais de l'ECP), favorisent la survenue de thrombose à l'origine d'une perte de fonction par ischémie tissulaire, et sont également pourvoyeurs de fibrose tissulaire. Cette dernière est induite de façon directe par le relargage de TGF $\beta$ , d'IL-4, et d'IL-13 par les EO ou indirecte via la production des granules, notamment d'EPX (Gieseck, Wilson, et Wynn 2018; Reiman *et al.* 2006; Van Epps et Bankhurst 1978; Maino *et al.* 2012). Ainsi, les EO jouent un rôle majeur dans la pathogénie de la PNS (Mortuaire *et al.* 2020; Vanderhaegen *et al.* 2022).

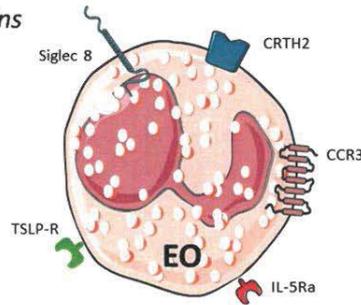
L'hypothèse de l'immunité locale/remodelage/réparation, proposée pour la première fois par Lee *et al.*, suggère également que les EO jouent également un rôle bénéfique dans l'homéostasie (J. J. Lee *et al.* 2010). En effet, au-delà de ce rôle toxique sur les tissus l'incriminant comme cellule majeure de la PNS, les rôles connus à ce jour des EO sont multiples et synthétisés au sein de la **Figure 12** (homéostasie du glucose, remodelage tissulaire via la dégranulation de protéines cytotoxiques, réparation du foie et des muscles, régulation de l'épithélium, des neurones et du microbiome, et immunité) (Klion, Ackerman, et Bochner 2020; Weller et Spencer 2017).

### Host protective

Defense against mucosal pathogens

Anti-tumoral effect

- Cytotoxicity by granule proteins (EPX, EDN, MBP, ECP)
- DNA traps (ETosis)
- Nitric oxide release



### Immunoregulatory

T cell

- Antigen presentation
- Th2 polarization

B cell

- Polyclonal IgE, IgM and secretory IgA production
- Plasma cells survival

Dendritic cell

- Activation
- Maturation

### Proinflammatory

Airway inflammation

- Tissue damage and remodeling
- Fibrosis
- Airway hyperresponsiveness
- Mucus hypersecretion

### Homeostasis

Metabolic homeostasis

- Maintenance of adipose, protection against type 2 diabetes

Plasma cells survival

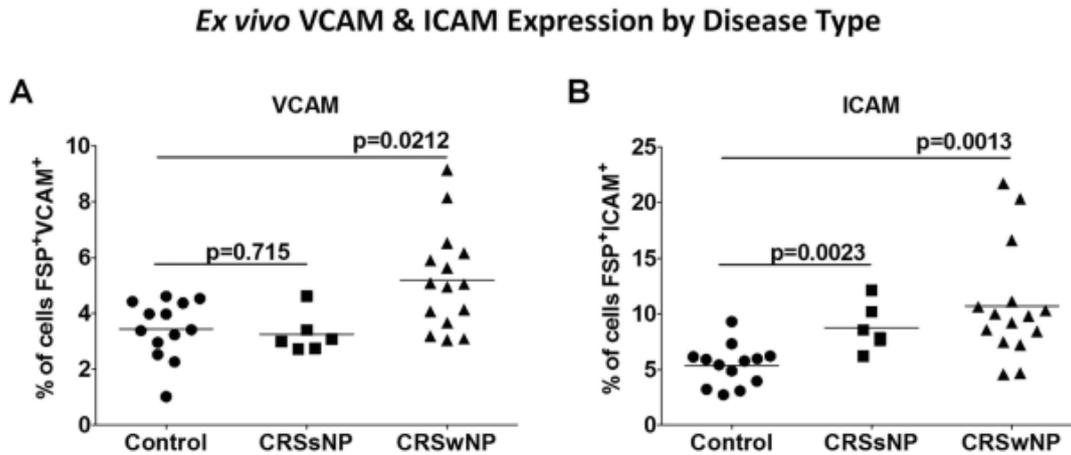
Thymic and mammary gland development

### Figure 12 : Liste des différentes fonctions effectrices de l'EO

Lorsqu'ils sont activés, les EO favorisent la protection de l'hôte (effets directs sur les pathogènes ou les tissus tumoraux), les réponses immunitaires (modulation de la fonction des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules dendritiques), et l'inflammation des voies respiratoires (lésions tissulaires, remodelage et hypersécrétion de mucus). Ils sont également impliqués dans l'homéostasie.

Source : (Vanderhaegen et al. 2022)

L'augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) dans les EO activés est associée à l'extravasation et à l'infiltration des EO dans le tissu et semble initier également le remodelage de la muqueuse sinusienne (Batzakakis et al. 2014; Papon et al. 2002). Les molécules d'adhésion cellulaire situées à la surface des cellules sont impliquées dans la liaison avec d'autres cellules ou avec la MEC. Les molécules d'adhésion sur les leucocytes, les fibroblastes et l'endothélium vasculaire permettent l'extravasation des leucocytes des vaisseaux et la migration vers les sites d'inflammation (Kong et al. 2018). Il a été démontré que l'expression par les fibroblastes de la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM) attire les EO et les mastocytes contribuant à l'asymétrie des cytokines T2, tandis que l'ICAM-1 attire les PNN et, dans une moindre mesure, les EO (Oyer, Nagel, et Mulligan 2013). L'expression de VCAM et d'ICAM-1 était plus faible chez les témoins, que chez les patients atteints de PNS (Oyer, Nagel, et Mulligan 2013) (**Figure 13**). Il n'est pas encore complètement élucidé si c'est le défaut de marqueurs d'adhésion cellulaire ou les conséquences sur le recrutement des effecteurs qui jouent un rôle clé dans la pathogénie de la PNS. Plus précisément, les modifications de l'expression des molécules d'adhésion pourraient simplement être la conséquence de l'inflammation tissulaire présente dans la muqueuse nasosinusienne des patients atteints de PNS. Quoiqu'il en soit, cela pourrait conduire à des traitements novateurs limitant l'infiltration éosinophilique et neutrophilique nasosinusienne (Oyer, Nagel, et Mulligan 2013).



**Figure 13. Expression de VCAM et ICAM selon le phénotype**

*Expression de VCAM et ICAM ex vivo dans des suspensions de cellules provenant de témoins, de RSC sans polype et de PNS. L'ordonnée correspond à la proportion de fibroblastes.*

*Source : (Oyer, Nagel, et Mulligan 2013)*

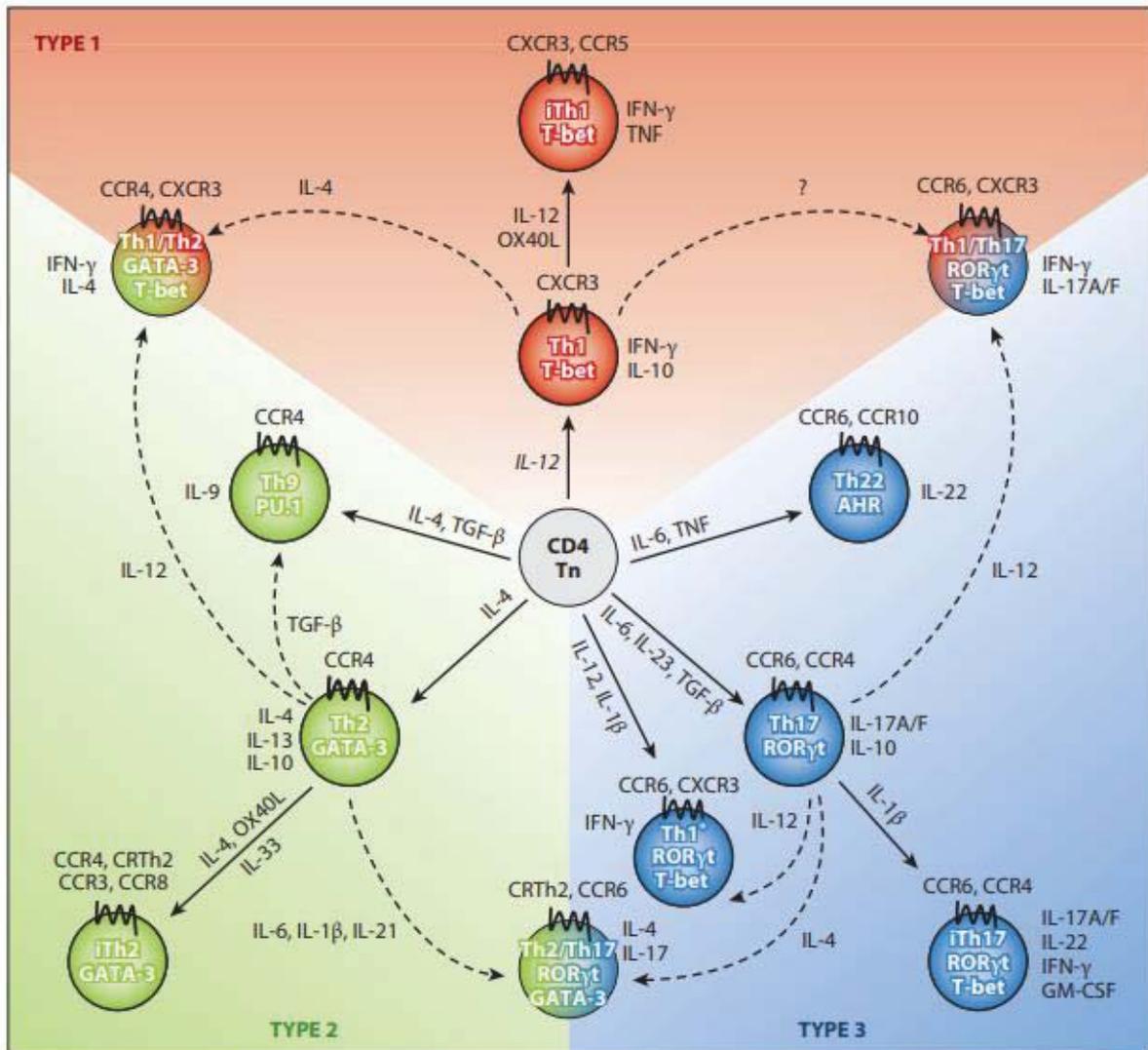
L'importance des EO dans la pathogénie de la PNS est largement étayée par des données cliniques, identifiant l'éosinophilie sanguine comme un facteur prédictif de récurrence après une chirurgie sinusienne pour PNS (Brescia *et al.* 2017; Rosati *et al.* 2020; Nakayama *et al.* 2011; Lou *et al.* 2015; Vlaminck *et al.* 2014; Tosun *et al.* 2010). Des niveaux élevés d'EO sériques ont été corrélés avec un risque accru de PNS et de récurrence après traitement (Brescia *et al.* 2017). Des études histologiques ont également été menées pour définir des profils phénotypiques chez les patients atteints de PNS (Mortuaire *et al.* 2015). Une classification histologique des polypes en 3 sous-types a été établie : le polype œdémateux riche en EO (64% des cas), le polype fibreux riche en collagène et glandes sous-muqueuses (9%) et le polype intermédiaire à composante mixte fibreuse et œdémateuse mais à prédominance éosinophile (27%). À l'inverse des patients asthmatiques où l'éosinophilie tissulaire est corrélée à la sévérité, aucune corrélation avec la sévérité de la PNS n'a été mise en évidence.

### c. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) jouent de multiples rôles dans la défense immunitaire, notamment contre les infections intracellulaires et extracellulaires (**Figure 14**). Ils activent et recrutent les cellules effectrices, y compris les phagocytes, tuent les cellules infectées et aident les lymphocytes B (LB) à produire des Ig. Les LT mémoire constituent une forme durable d'activité innée au niveau des barrières épithéliales comme celle de l'épithélium nasal humain.

Le rôle principal des LT auxiliaires CD4<sup>+</sup> est d'envoyer des signaux à d'autres types de cellules immunitaires, y compris les cellules tueuses CD8<sup>+</sup> (Sallusto 2016). La perte de la fonction des LT auxiliaires rend l'organisme vulnérable à un large éventail d'infections, comme mis en évidence chez les patients contaminés par le virus de l'immunodéficience humaine non traités (Martini et Noët 1993). Les LT CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en sous-ensembles de cellules effectrices qui produisent chacun des ensembles distincts de cytokines aidant à la défense contre les infections dans les tissus (LT1, LT2, LT17), un quatrième sous-ensemble qui active les LB dans les organes lymphoïdes secondaires (LT folliculaires auxiliaires) (Abul K. Abbas 2020) et un cinquième sous-ensemble LT régulateurs (LTreg) qui contribuent à interrompre le processus inflammatoire (Abul K. Abbas 2020). Les LT1 sont induits, avec l'aide des cellules de l'immunité de type 1 (CLI1), par les microbes ingérés par les macrophages (Sallusto 2016). Ils stimulent l'élimination des microbes ingérés grâce à la phagocytose, induite par la sécrétion d'IFN $\gamma$  et du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et  $\beta$  (TNF $\beta$ ). En effet, la sécrétion de ces cytokines entraîne l'activation des macrophages, augmente la présentation antigénique, recrute l'aide

des LB, permet d'induire la commutation isotypique vers les sous-classes d'IgG adaptées, et l'activation des PNN (Commins, Borish, et Steinke 2010; Sallusto 2016). Les LT2 sécrètent les cytokines T2 (IL-4, -5 et -13) jouant un rôle dans le recrutement et l'activation des EO, la commutation isotypique vers les IgE et IgG4, et la production de mucus (Henry, Inclan-Rico, et Siracusa 2017). Leurs effets seront détaillés dans le chapitre 2.1.2. Les LT17 se développent en réponse aux infections bactériennes et fongiques extracellulaires et induisent des réactions inflammatoires détruisant ces organismes. Les LT17 stimulent le recrutement des PNN et des monocytes et la production de défensines par la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 (Sallusto 2016).



**Figure 14. Destin des Lymphocytes T et cytokines associées**

les LT naïfs reçoivent différents signaux d'activation qui induisent l'expression de facteurs de transcription spécifiant une différenciation en lignées distinctes de LT ayant chacune leurs propriétés. Les lignes en pointillé représentent les changements phénotypiques dus à la plasticité des LT dont l'existence a été démontrée *in vivo* ou *in vitro*.

Source : (Sallusto 2016)

Les LT CD4<sup>+</sup> se différencient et acquièrent des fonctions distinctes pour lutter contre des pathogènes spécifiques, mais peuvent également adapter leurs fonctions selon les circonstances (O'Shea et Paul 2010; DuPage et Bluestone 2016). Bien que cette plasticité phénotypique puisse être potentiellement délétère et entraîner une pathologie, la flexibilité des LT offre également des avantages qui ont conduit à sa préservation au cours de l'évolution (DuPage et Bluestone 2016). L'étude des relations entre les LT et les agents microbiens ont permis de mieux comprendre l'hétérogénéité fonctionnelle des LT CD4<sup>+</sup>, et le rôle de chaque sous ensemble (Sallusto 2016).

Dans la PNS, les voies adaptatives protectrices se dérèglent, généralement avec une réponse inflammatoire excessive et prolongée participant à la pathogénie de la PNS (B. K. Tan, Min, et Hulse 2017). Une diminution du nombre de LTregs et une augmentation des autres sous-populations de LT a été mis en évidence dans la PNS et pourraient contribuer à chroniciser la réponse inflammatoire (Palmer *et al.* 2017). En effet, un nombre élevé de LT2 et d'EO a été rapporté chez les patients caucasiens atteints de PNS, tandis qu'un nombre accru de LT1, LT17 et de PNN a été retrouvé chez les patients asiatiques atteints de PNS (X. Wang *et al.* 2016; B. K. Tan *et al.* 2017; Lara Derycke *et al.* 2014). Néanmoins, il y a de plus en plus d'éléments qui suggèrent que la prévalence de la PNS T2 est en augmentation en Asie bien que les facteurs étiologiques sous-jacents à cette évolution soient encore inconnus (Yuan Zhang *et al.* 2017). En revanche, devant la rapidité du processus, c'est un changement dans les expositions environnementales avec des variations épigénétiques secondaires qui a été évoqué pour expliquer cette évolution. Il est important de noter qu'une augmentation globale des maladies T2 a été observée dans les pays occidentaux à partir du début du 20<sup>ème</sup> siècle et les changements en Asie semblent se manifester dans les régions qui adoptent un style de vie plus occidental (Yuan Zhang *et al.* 2017). Une étude plus approfondie de ces changements en temps réel dans la PNS asiatique pourrait être utile pour identifier les déterminants environnementaux clés qui pourraient conduire à une réduction de l'incidence de la PNS T2 en Europe et aux USA.

Les LT CD4<sup>+</sup> qui expriment Foxp3 et qui ont une activité immunosuppressive sont connus sous le nom de Tregs CD4<sup>+</sup> (Gavin et Rudensky 2003). Les LTregs se développent dans le thymus ou les tissus périphériques lors de la reconnaissance d'auto-Ag et suppriment l'activation de lymphocytes potentiellement nocifs spécifiques de ces auto-Ag. Ils sont donc essentiels au maintien de la tolérance et de l'homéostasie immunitaire (Pant et Macardle 2014; Macri *et al.* 2014; Lefrançois *et al.* 2016; B. K. Tan *et al.* 2011; Jeffe *et al.* 2013; Tsybikov *et al.* 2015). Comme mentionné préalablement, les LTregs semblent être diminués dans la PNS et des auto-Ac ont été rapportés (Tsybikov *et al.* 2015). Il a été mis en évidence que plusieurs sous-populations de LT peuvent être activées simultanément chez un patient atteint de PNS et que les cytokines produites peuvent avoir un effet suppressif ou stimulant sur les autres sous-populations. Ainsi, en fonction de la modulation des sous-populations induites par les cytokines, la réponse inflammatoire peut être contrôlée ou au contraire excessive permettant à la PNS de se développer et affectant potentiellement la réponse au traitement (Stevens *et al.* 2019; M. Wang *et al.* 2019). Les LT CD8<sup>+</sup> activés par l'Ag microbien se différencient en LT cytotoxiques (LNK) capables de tuer les cellules infectées (notamment les cellules infectées par un virus) exprimant l'Ag (Michael *et al.* 1989). Les LNK tuent également les cellules malignes et autres cellules endommagées (Abul K. Abbas 2020). Comme mentionné précédemment, les niveaux de LT sont plus élevés dans la PNS, mais le ratio de LT CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> est également plus élevé, ce qui indique un renforcement particulier de la population de LT cytotoxiques (Ickrath *et al.* 2018; Xiao *et al.* 2016). Dans leur étude, Xiao *et al.* ont analysé les marqueurs cellulaires, l'expression des cytokines et les facteurs de transcription dans les LT CD8<sup>+</sup> exprimant l'IL-21 dans les tissus des polypes des patients atteints de PNS. Ils ont ainsi montré que la majorité des LT CD8<sup>+</sup> produisant de l'IL-21 étaient des cellules mémoires effectrices et qu'elles coexprimaient l'IFN $\gamma$ . A ce jour, les LT CD4<sup>+</sup> sont reconnus comme jouant un rôle important dans la pathogénie de la PNS, mais le rôle des LT CD8<sup>+</sup> lui, reste flou (Xiao *et al.* 2016).

#### d. Les lymphocytes B (LB) et leurs anticorps (Ac)

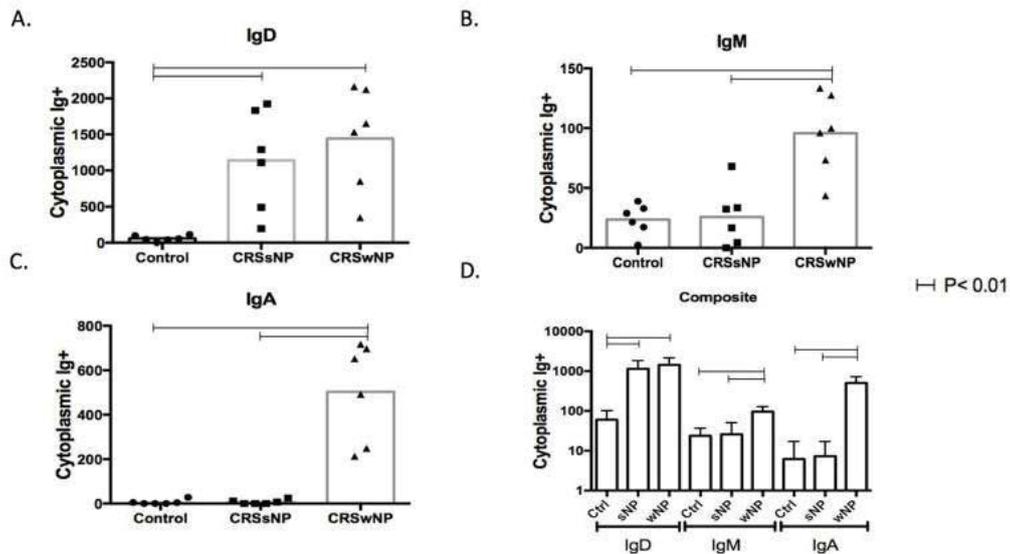
L'immunité humorale est un mécanisme de défense de l'hôte médié par les Ig produites et sécrétées par les LB qui agissent dans la circulation sanguine et les tissus périphériques comme la muqueuse nasale (Abul K. Abbas 2020). Les Ig utilisent leurs fragments de liaison à l'Ag (Fab) pour se lier et bloquer les effets nocifs des microbes et des toxines. Le changement d'isotype de la chaîne lourde et la maturation de l'affinité renforcent les fonctions protectrices des Ig (Abul K. Abbas 2020). Les principales fonctions des Ig sont de bloquer ou de neutraliser les microbes et de favoriser leur ingestion par les LNK, d'activer les réactions médiées par les mastocytes (IgE) et les EO, et d'activer le système du complément.

L'IgA, une fois sécrétée, agit de concert avec le système du complément, d'autres facteurs de la protection innée et la CMC pour limiter la colonisation des muqueuses sans inflammation dommageable pour les tissus (Cerutti, Chen, et Chorny 2011). Cette IgA est de faible affinité et elle est générée par les LB extrafolliculaires (plasmocytes situés en dehors des centres germinaux sécrétant des IgM permettant une réponse initiale rapide à l'Ag mais peu spécifique et de courte durée). En cas de brèche active dans la muqueuse respiratoire, la sécrétion d'IgA d'affinité plus élevée peut augmenter et, en combinaison avec l'aide de l'IgG, une réponse inflammatoire robuste s'ensuit (Aazami *et al.* 2018). Il s'agit d'Ig à haute affinité produites par les LB folliculaires (ceux des centres germinaux qui subissent des cycles de prolifération accompagnés d'une maturation d'affinité LT dépendantes).

L'IgE est l'Ig de l'inflammation T2, dont la commutation isotypique est régulée par les cytokines T2. Les rôles des IgE sont multiples : présentation de l'Ag, augmentation de la survie des mastocytes, homéostasie des muqueuses, et défense contre les virus, les bactéries, les champignons et les parasites (Zhai *et al.* 2018; Shintaro Baba *et al.* 2017; P. Gevaert *et al.* 2013; S. Baba *et al.* 2014; Stone, Prussin, et Metcalfe 2010). Les fragments cristallisables (Fc) des IgE et des IgA sont souvent la portion qui se fixe sur les mastocytes et les EO, respectivement (Abul K. Abbas 2020). L'IgE locale est l'Ac le plus souvent impliqué dans la pathogénie de la PNS. Il a été démontré que les niveaux élevés d'IgE dans les polypes nasaux sont induits par la cytokine BAFF (Dilidaer *et al.* 2017) secondairement à une commutation isotypique indépendante de l'atopie (P. Gevaert *et al.* 2013) et qu'ils prédisent un mauvais pronostic. Ces IgE seraient également liées à la présence d'IgE dirigées contre les toxines du superAg du Staphylocoque (P. Gevaert *et al.* 2005). Ces toxines ont la capacité d'agir comme des superAg dans les polypes nasaux, activant les LT et les LB et favorisant une réponse IgE polyclonale (J.-B. Chen *et al.* 2017). Les IgE polyclonales, pour lesquelles des niveaux élevés ont été identifiés dans les polypes nasaux, peuvent déclencher la dégranulation des mastocytes, ce qui renforce le rôle important attribué aux IgE dans la pathogénie de la PNS (Patou *et al.* 2011). Le potentiel thérapeutique des anti-IgE dans le traitement de la PNS, mais aussi de l'asthme a été largement démontré (Philippe Gevaert *et al.* 2013; 2020; 2022; Bidder *et al.* 2018; Luskin *et al.* 2005).

L'IgG est l'Ac circulant le plus courant avec quatre sous-classes (IgG1 à 4) et une demi-vie de 7 à 21 jours (21J). Les IgG ont plusieurs fonctions effectrices : elles neutralisent les microbes et les toxines, opsonisent les Ag, et activent la voie classique du système du complément. Cette dernière est responsable de la cytotoxicité des LNK et de l'inhibition en retour des LB (Abul K. Abbas 2020). Les IgG4, comme les IgE, sont un sous-type mineur d'IgG dont la production est également régulée par les cytokines T2. L'expression locale des IgG4 est élevée dans la RSC éosinophile, phénotype au sein duquel on retrouve également un taux plasmatique plus élevé de CIL2, de plasmocytes, de LB et de LT CD8<sup>+</sup> activés (Palmer *et al.* 2017; Lara Derycke *et al.* 2014).

L'IgD est un isotype d'Ac énigmatique, mieux connu lorsqu'il est coexprimé avec l'IgM mais qui permet l'activation de mastocytes qui participeront à la commutation isotypique vers la classe IgE. L'expression des IgD est augmentée dans le tissu sinusien de patients atteints de PNS (**Figure 15**) (Sokoya *et al.* 2017).



**Figure 15. Fréquences des cellules Ig<sup>+</sup> dans les tissus sinusiens.**

Expression des IgD (A), IgA (B) et IgM (C) par immunofluorescence dans les tissus sinusiens de sujets témoins sains (rond), de patients atteints de RSC sans polype (carrés) et de PNS (triangles). Les points représentent le nombre moyen de cellules par échantillon de tissu et la boîte, les valeurs médianes. La Figure 2D représente un graphique composite exprimé en Log<sub>10</sub>. Les barres horizontales représentent la significativité statistique ( $p < 0,01$ ). Les barres d'erreur représentent la déviation standard.  
Source : (Sokoya *et al.* 2017)

Les LB et les Ig ont rapidement été impliqués dans la pathogénie de la PNS. Le déficit immunitaire le plus courant est le déficit en Ig. Il peut être associé aux RSC sans polype et aux PNS dites secondaires (B. K. Tan *et al.* 2018). Un déficit en Ig peut conduire à des infections sinusales aiguës récurrentes et au long cours à un RSC avec ou sans polype (Keswani *et al.* 2017). Cependant, il a été mis en évidence des niveaux élevés d'IgD et la plupart des cas de RSC sans polype ne présentent aucun déficit humoral (Zhai *et al.* 2018). De la même façon, le tissu de patients atteints de PNS contient des niveaux élevés de LB, d'IgA, d'IgM, d'IgG et d'IgE (Tsybikov *et al.* 2015; M. Wang *et al.* 2019; Ickrath *et al.* 2018; Xiao *et al.* 2016; S. Feldman *et al.* 2017; P. Gevaert *et al.* 2005; Lau *et al.* 2017). La production d'Ig dans la PNS est due en partie à des niveaux élevés de la cytokine BAFF (facteur d'activation des LB) dans le tissu des polypes nasaux (Kato *et al.* 2008). Outre la prolifération des LB, BAFF a également été associée à une commutation isotypique vers les IgE et les IgA ainsi qu'au développement d'Ig auto-immunes. Des niveaux accrus de plusieurs auto-Ac spécifiques ont été trouvés dans le tissu des polypes nasaux par rapport aux tissus de patients contrôles. En particulier, les auto-Ac ciblant les noyaux, tels que les IgG et IgA anti-dsDNA et particulièrement dans les polypes nasaux de patients nécessitant une reprise chirurgicale pour récurrence. Bien que la pathogénie de ces Ac reste à élucider, la présence d'auto-Ac suggère que le microenvironnement muqueux nasosinusal favorise l'expansion de clones de LB autoréactifs et un rôle de l'auto-immunité dans la pathogénie de la PNS (B. K. Tan *et al.* 2011). Une cible spécifique semble être la protéine du soi BP180, qui est une protéine d'ancrage clé dans la peau et la muqueuse nasale. Les Ac anti-BP180 étaient élevés chez les patients atteints de PNS, suggérant un ciblage auto-immun de la barrière épithéliale (Jeffe *et al.* 2013).

Le système du complément est une voie enzymatique du système immunitaire inné qui joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes (lyse des microbes) et qui peut aussi entraîner des lésions tissulaires, en particulier dans les cas d'auto-immunité. À ce stade, il n'existe que de faibles preuves d'un défaut de complément associé à la pathogénie de la PNS. En revanche, les preuves d'une activation excessive du complément dans la pathogénie de la PNS sont plus robustes, suggérant l'importance des événements médiés par les Ac, qu'ils soient liés ou non à l'auto-immunité (Thibaut Van Zele *et al.* 2009; B. K. Tan *et al.* 2018).

### e. Les polynucléaires neutrophiles (PNN)

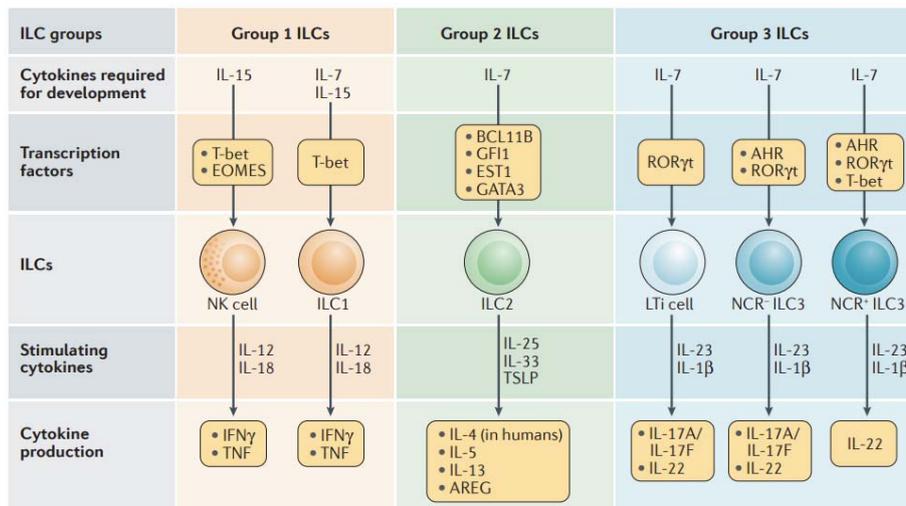
Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont des leucocytes granulocytaires abondants dans le sang. Ils jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire aiguë en identifiant et en éliminant les agents pathogènes dans les tissus infectés (phagocytose précoce et destruction des microbes extracellulaires). Cependant, leur implication dans la PNS n'est pas encore entièrement élucidée en raison d'une demi-vie tissulaire relativement courte (1-2J). Cela signifie qu'ils ont une durée de vie limitée une fois qu'ils ont quitté la circulation sanguine et qu'ils ont pénétré dans les tissus (W. J. Fokkens *et al.* 2020). Des niveaux tissulaires élevés de PNN ont été mis en évidence dans d'autres pathologies des voies aériennes, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la mucoviscidose (Snelgrove *et al.* 2010; Snelgrove 2011). Un des mécanismes expliquant cette inflammation neutrophile est lié à un tripeptide, le N-acétyl Pro-Gly-Pro (N-PGP), un chimio attractant des PNN, dérivé de la dégradation de la MEC du tissu pulmonaire (Weathington *et al.* 2006). En cas d'inflammation aiguë provoquée par les PNN, le N-PGP est dégradé, ce qui facilite la résolution de l'inflammation. En revanche, cette dégradation enzymatique peut être inhibée par certains aérocontaminants, comme la fumée de tabac, ce qui entraîne l'accumulation de PGP et de PNN (Snelgrove *et al.* 2010).

Le recrutement des PNN est assuré en grande partie via les PRR ou les signaux secondaires à une lésion tissulaire, ainsi que par la libération épithéliale d'IL-8 (Rudack *et al.* 2007). En réponse à une infection bactérienne ou fongique, la production de PNN à partir de la moelle osseuse augmente tout comme la neutrophilie sanguine. Chez les Caucasiens atteints de PNS, deux phénotypes cellulaires peuvent être identifiés, la PNS avec infiltration éosinophilique prédominante et celle avec une infiltration neutrophilique prédominante (van Drunen *et al.* 2009). Chez les patients chinois atteints de PNS, l'infiltration neutrophilique dans les polypes prédomine (Nan Zhang *et al.* 2006; 2008). Chez les patients caucasiens atteints de PNS, une infiltration neutrophilique a été observée même au sein de polypes hautement éosinophiliques (Pothoven *et al.* 2017; T. Van Zele *et al.* 2006). Les PNN sont fortement stimulés par les cytokines T3 mais leurs infiltrats coexistent souvent avec des EO stimulés par les cytokines T2, ce qui suggère la possibilité que la neutrophilie tissulaire soit le reflet d'une réponse superposée contre le microbiote chez les patients atteints de PNS (L. Derycke *et al.* 2012; D. W. Kim *et al.* 2019; H. Wang *et al.* 2018). Les mécanismes précis de l'association entre infiltrat neutrophile et pathogénie de la PNS ne sont pas complètement élucidés. Seulement quelques études ont mis en évidence que les PNN pouvaient contribuer au remodelage tissulaire et à l'altération de la barrière épithéliale dans la PNS en produisant du TGFβ2 et de l'OSM (Pothoven *et al.* 2017; 2015; L.-L. Shi *et al.* 2013). Les effets de l'OSM sur l'épithélium seront détaillés dans une section dédiée (chapitre 2.1.2.).

### f. Les cellules lymphoïdes innées (CLI)

Les cellules lymphoïdes innées (CLI) sont des lymphocytes comprenant des cellules tueuses naturelles et au moins trois sous-ensembles cellulaires distincts (CLI1, CLI2, CLI3) produisant rapidement des cytokines lors de leur activation (A. I. Lim *et al.* 2017). Les CLI peuvent agir comme des défenseurs de première ligne au sein des voies respiratoires. Les CLI1, CLI2, et CLI3 correspondent aux sous-ensembles T1, T2 et T17 des cellules T CD4+, respectivement (Abul K. Abbas 2020). En réponse à des signaux environnementaux locaux étroitement régulés, les CLI peuvent générer des caractéristiques d'autres sous-types de CLI, un processus connu sous le nom de plasticité. Des avancées récentes dans le domaine des CLI2 ont permis de découvrir qu'elles peuvent rapidement se transformer en CLI1 ou en CLI3, en fonction des cytokines et des chimiokines produites par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ou les cellules épithéliales. Sous l'effet de facteurs déclenchants encore inconnus, ce réseau complexe de signaux peut être dérégulé (Krabbendam *et al.* 2018).

Bien qu'il existe une plasticité intergroupe, chaque groupe de CLI semble avoir un rôle physiologique et un profil cytokinique distinct associé à l'inflammation T1, T2 et T3 (**Figure 16**) (Ebbo *et al.* 2017). Les CLI1 répondent aux virus et aux bactéries intracellulaires, favorisant une réponse lymphocytaire T1 et libérant des cytokines T1, dont l'IFN $\gamma$ . Les CLI2 participent à la réparation des tissus, jouent un rôle de médiateur dans les allergies, favorisent les réponses T2 et produisent les cytokines correspondantes, IL-4, IL-5 et IL-13. Les CLI3 ciblent les organismes extracellulaires, favorisent les réponses Th17 et libèrent des cytokines T3 (IL-17 et IL-22) (Kortekaas Krohn *et al.* 2018; Shikhagaie *et al.* 2017).



**Figure 16. Classification des cellules de l'immunité innée (CLI)**

Trois sous-groupes de CLI ont été définis sur la base de leur expression de facteurs de transcription clés et de leur production de cytokines.

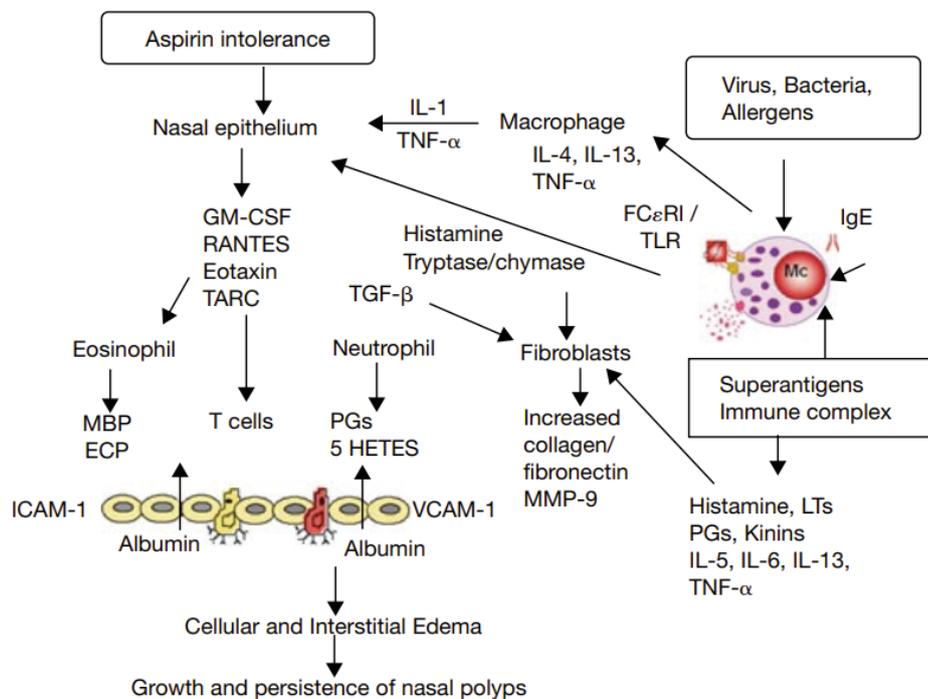
Source : (Ebbo *et al.* 2017)

Les CLI2 sont les CLI les plus étudiées dans la RSC où elles semblent jouer un rôle important notamment dans les RSC présentant une inflammation T2, comme la PNS. Elles sont une des sources importantes de la production de cytokines T2 dont le rôle dans la PNS sera détaillé dans un chapitre dédié (chapitre 2.1.2.). Par ailleurs, alors que les cytokines T1 et T3 mentionnées précédemment sont présentes dans les tissus de certains patients atteints de RSC, l'importance de la contribution des CLI1 et CLI3 dans la pathogénie de la RSC n'est pas claire. En revanche, les signaux épithéliaux à l'origine de l'activation des CLI sont bien identifiés, il s'agit des alarmines (IL-25, IL-33 et TSLP) (Golebski *et al.* 2016; Dogan, Sahin, et Yenisey 2019; Nagata *et al.* 2019; W. W. Wang *et al.* 2018; Ouyang *et al.* 2013; Nagarkar *et al.* 2013) dont le rôle dans la PNS sera également détaillé dans le chapitre 2.1.2. dédié aux cytokines. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires qui régulent le développement des CLI et leurs fonctions effectrices pourrait permettre de mieux comprendre leur rôle dans la PNS.

## g. Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules immunitaires contenant des granules, largement répandus dans tous les tissus conjonctifs, qui interagissent avec l'environnement extérieur, tels que la peau et les muqueuses. Les mastocytes sont présents en particulier sous les épithéliums et à proximité des vaisseaux sanguins et ils jouent un rôle dans l'immunité innée et la cicatrisation des blessures (Piliponsky et Romani 2018). Ils peuvent être activés par des agents extérieurs liant les TLR et par des composants du système du complément dans le cadre de l'immunité innée ou par un mécanisme Ac dépendant dans le cadre de l'immunité adaptative. Les granules des mastocytes contiennent des amines vasoactives telles que l'histamine qui provoquent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité capillaire, ainsi que des enzymes protéolytiques, des médiateurs lipidiques, des chimiokines et des cytokines, qui assurent une défense contre les agents extérieurs. Les mastocytes sont également impliqués dans les réactions allergiques IgE médiées (Piliponsky et Romani 2018).

Les mastocytes ont la capacité d'induire, d'augmenter et de maintenir l'inflammation éosinophile par l'intermédiaire des processus IgE-dépendants et IgE-indépendants (**Figure 17**), ce pourquoi ils ont été beaucoup étudiés dans la PNS (Ruby Pawankar *et al.* 2007; Cao *et al.* 2014). Plus précisément, le nombre de mastocytes activés est corrélé positivement au taux d'IgE locales et au nombre d'EO chez les patients atteints de PNS. La commutation isotypique (changement de classe d'Ig produite par le plasmocyte) à l'origine de la production d'IgE dirigée contre les aéroallergènes pourrait être stimulée par des mastocytes activés (Cao *et al.* 2014; Zhai *et al.* 2018). Les mécanismes d'activation IgE indépendants, tels que le ligand du cluster de différenciation 30 (CD30L), pourraient également jouer un rôle (Zhai *et al.* 2019). Les niveaux d'expression de l'ARNm CD30L et le nombre de cellules CD30L positives (CD30L<sup>+</sup>) et de mastocytes CD30L<sup>+</sup> tryptase<sup>+</sup> sont augmentés dans les polypes éosinophiles mais pas dans les polypes non éosinophiles par rapport aux tissus issus de patients contrôles (Zhai *et al.* 2019). L'activation des mastocytes médiée par CD30/CD30L pourrait favoriser l'inflammation éosinophile IgE indépendante chez les patients atteints de PNS.



**Figure 17. Rôle des mastocytes dans la polyposse nasosinusienne (PNS)**

Conséquences de l'activation des mastocytes et facteurs déclenchant leurs activations avec les principales cytokines et chimiokines impliquées.

Source (R. Pawankar 2001)

Les mastocytes, ainsi que les plaquettes, peuvent être des sources de leucotriènes pro-inflammatoires (cysLTs) et de prostaglandines (PGD<sub>2</sub>) dans la PNS et la N-ERD (Cahill et Laidlaw 2016; Borish 2019). Dans la PNS, bien que des mastocytes soient retrouvés en concentration importante au sein de la partie glandulaire de l'épithélium des polypes de patients atteints de PNS, leur implication reste incomplètement élucidée (Takabayashi *et al.* 2012; Zhai *et al.* 2019). En revanche, des essais cliniques randomisés récents ont mis en évidence l'efficacité des anti-IgE (omalizumab) dans le traitement de la PNS. Cette efficacité suggère l'importance potentielle des mastocytes chez les patients atteints de PNS associés à des niveaux d'IgE élevés (Philippe Gevaert *et al.* 2013; 2006; W. J. Fokkens *et al.* 2023).

#### h. Les lymphocytes natural killer (LNK)

Les lymphocytes « natural killer » (LNK) sont un type de lymphocyte cytotoxique du système immunitaire inné. Les LNK reconnaissent les cellules infectées et réagissent en tuant ces cellules et en sécrétant de l'IFN $\gamma$  activant les macrophages (Michael *et al.* 1989). Ils ne produisent pas d'Ig ni n'expriment de récepteurs aux Ags comme les LT. Lorsqu'ils sont activés par des cellules infectées (*e.g.* par un virus), ils dégranulent des protéines qui pénètrent dans les cellules infectées et induisent l'apoptose. Kim *et al.* ont effectué une cytométrie de flux sur les cellules du sang périphérique, et ils ont mis en évidence que chez les patients atteints de PNS, la capacité des LNK à dégranuler et à produire des cytokines (IFN $\gamma$  ou TNF $\alpha$ ) était altérée par rapport au contrôle (J. H. Kim *et al.* 2013). De la même façon, l'apoptose des EO médiée par les LNK est significativement réduite chez les patients atteints de PNS par rapport aux contrôles (J. H. Kim *et al.* 2016). Dans l'ensemble, l'immunité innée est cruciale pour maintenir l'homéostasie sinusienne, et il est très probable qu'une homéostasie perturbée entre le microbiote et le système immunitaire inné de l'hôte soit un événement clé dans la pathogénie de la PNS.

#### i. Les monocytes

Les monocytes et les macrophages sont des régulateurs essentiels de l'initiation, du maintien et de la résolution de la réparation après une blessure. Pour remplir ces fonctions disparates, ils subissent des changements phénotypiques majeurs en réponse aux signaux présents dans l'environnement (Wynn et Barron 2010; Wynn et Vannella 2016). Pendant l'inflammation, les monocytes migrent dans les tissus et se différencient en macrophages, qui peuvent survivre longtemps, voire des années (Abul K. Abbas 2020). Les macrophages sont présents dans tous les tissus conjonctifs et organes du corps. Ils jouent divers rôles : i) élimination directe de particules, ii) réponse primaire face aux agents pathogènes, iii) homéostasie tissulaire, iv) coordination de la réponse immunitaire adaptative, et v) inflammation et réparation tissulaire (Banks *et al.* 2014). Il existe deux types de macrophages activés, M1 et M2. Les macrophages M1 sont le phénotype dominant observé dès les premiers stades de l'inflammation, dont l'activation est pilotée par les cytokines T1 qui déclenchent la réponse pro-inflammatoire nécessaire pour tuer les pathogènes intracellulaires. L'autre voie est déterminée par les cytokines T2 qui entraînent l'activation des macrophages M2. Ce changement phénotypique semble jouer un rôle dans la PNS (Poposki *et al.* 2011). En effet, ils ont une capacité de phagocytose réduite et sécrètent également des niveaux élevés de CCL18, une cytokine connue pour être chimiotactique pour les cellules dendritiques, les LT naïfs et les LT2 contribuant ainsi à la pathogénie de la PNS (Krysko *et al.* 2011; Peterson *et al.* 2012). Les macrophages peuvent également recruter des EO et des PNN sur le site de l'inflammation (Perić *et al.* 2015). Les macrophages sont aussi des sources importantes de facteur XIII-A chez les patients caucasiens atteints de PNS, ce qui induit un dépôt excessif de fibrine et un œdème tissulaire au sein des polypes nasaux (Khawar, Abbasi, et Sheikh 2016; Takabayashi *et al.* 2013).

### j. Les basophiles

Les basophiles sont des granulocytes que l'on trouve principalement dans la circulation, connus pour leur rôle dans les maladies allergiques et l'immunité contre les parasites. Ils ont été impliqués dans les réponses T2, servant peut-être de source précoce d'IL-4 à l'origine la polarisation T2 des LT (Voehringer 2013). Ils sont particulièrement élevés dans les polypes des patients atteints de PNS sans intolérance à l'aspirine par rapport aux polypes N-ERD (Ruby Pawankar *et al.* 2007). Le mécanisme qui aboutit au phénotype N-ERD peut être un sous-endotype distinct d'inflammation T2 avec une activité PGD/leucotriène prépondérante (Cahill et Laidlaw 2016; Borish 2019). Les basophiles contribuent à l'inflammation à la fois directement par la libération de médiateurs inflammatoires, de cytokines et de facteurs de croissance et indirectement par l'activation d'autres populations cellulaires (Ruby Pawankar *et al.* 2007). Des preuves de plus en plus nombreuses placent les mastocytes (et très probablement les basophiles aussi) comme des éléments clefs dans la pathogénie de la PNS mais le rôle exact des basophiles n'est pas clairement élucidé.

### k. Les plaquettes

Les plaquettes sont des fragments cytoplasmiques dont la fonction principale est l'hémostase qui sera détaillée dans l'Axe 3 (Langer et Gawaz 2008). Elles adhèrent aux protéines matricielles sous-endothéliales exposées lors d'une brèche vasculaire (Yun *et al.* 2016). En outre, comme elles sont rapidement déployées sur les sites de lésions, elles peuvent potentiellement moduler les processus inflammatoires en interagissant avec les cellules effectrices et en sécrétant des médiateurs (Koupenova *et al.* 2018; Pankratz *et al.* 2016). Les plaquettes sont activées et constituent une source majeure de leucotriènes et PGD2 chez les patients avec une PNS, et, en particulier, avec une N-ERD (Shintaro Baba *et al.* 2017). Dans cette étude, les plaquettes étaient plus fortement activées chez les patients atteints de N-ERD que chez les patients atteints de PNS seule. En outre, des augmentations significatives de la vascularisation, de l'expression des gènes et des protéines pro-angiogéniques et des modifications de la morphogénèse des vaisseaux sanguins ont été observées chez les patients atteints de PNS par rapport aux contrôles. De plus, l'analyse de la morphologie des structures de jonctions inter endothéliales a mis en évidence des espaces inter-cellulaires plus grands chez les patients avec PNS que chez les patients contrôles, ce qui suggère une dysrégulation vasculaire induite par l'inflammation dans la pathogénie de la PNS (Khurana *et al.* 2021). Cependant, le rôle de l'activation des plaquettes dans la pathogénie de la PNS n'est pas encore élucidé.

## i. Tableau de synthèse

Type cellulaire	Fonctions	Implication dans la PNS
Cellule épithéliale	Défense contre les agents extérieurs Renouvellement cellulaire Production de cytokines Barrière épithéliale Clairance mucociliaire Réparation épithéliale	+++
Eosinophiles (EO)	Défense contre les agents extérieurs Remodelage tissulaire et fibrose Hyperréactivité bronchique et hypersécrétion de mucus Effets antitumoraux cytotoxiques	+++
Lymphocytes T (LT)	Défense contre les agents extérieurs (infections intra et extracellulaires) Différenciation en cellules effectrices : LT1, LT2, LT17, LB, Ltreg Production de cytokines T1, T2, et T3 Recrutement de PNN, EO, basophiles Activité cytotoxique direct (LNK) Modulation de la réponse inflammatoire Activation du système du complément Immunosuppression à visée régulatrice	LT2 et LT1 +++
Lymphocytes B (LB)	Défense contre les agents extérieurs Production d'Ig : IgA, IgE, IgG, IgM, IgD Commutation isotypique vers les IgE	IgE +++
Polynucléaires neutrophiles (PNN)	Défense contre les agents extérieurs (phagocytose précoce et agents extracellulaires) Modulation de la réponse inflammatoire Remodelage tissulaire Altération de la fonction de barrière	++
Cellules lymphoïdes de l'immunité innée (CLI)	Défense contre les agents agressants extérieurs Différenciation en cellules effectrices : CLI1, CLI2, CLI3 Plasticité entre les sous-types Production de cytokines T1 (CLI1), T2 (CLI2), T3 (CLI3)	CLI2 +++ CLI1, CLI3 ++
Mastocytes	Défense contre les agents agressants extérieurs Réparation épithéliale Libération de granules contenant des amines vasoactives (histamine), enzymes, cytokines, leucotriènes pro-inflammatoires et PGD2 Amplification de l'infiltrat par les EO Commutation isotypique (Ig vers IgE)	++
Lymphocytes natural killer (LNK)	Production d'IFN $\gamma$ Activation des macrophages Dégranulation de protéines cytotoxiques Induction de l'apoptose des EO	++
Monocytes/Macrophages	Réparation épithéliale Élimination directe de particules Homéostasie tissulaire Coordination de la réponse immunitaire adaptative Différenciation phénotypique en type 1 et type 2 Production de cytokine CCL18 (activation LT2) Recrutement d'EO et de PNN tissulaire	++
Basophiles	Production de cytokines T2 (IL-4) Production de facteurs de croissance Activation d'autres cellules de l'inflammation T1, T2	++
Plaquettes	Hémostase primaire Modulation de la réponse inflammatoire Production de leucotriènes et de PGD2 Modulation des jonctions serrées endothéliales	+

**Tableau 4. Synthèse des différents éléments cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire**

*L'implication dans la PNS de chacun des types cellulaires est appréciée sur une échelle allant de « + », peu de preuves, « ++ », rôle non complètement élucidé mais des concentrations tissulaires élevées ont été mises en évidence chez les patients atteints de PNS, à « +++ » rôle majeur largement documenté dans la littérature. Le terme de modulation fait référence aux cellules qui favorisent à la fois l'amplification et la résolution de la réponse inflammatoire.*

### 2.1.2. Les cytokines impliquées

Les cytokines sont de petites protéines moléculaires (~5-20 kDa) qui exercent des fonctions biologiques très variées. Elles sont synthétisées et sécrétées par les cellules immunitaires (macrophages, monocytes, LNK, LT et LB) et les cellules non immunitaires (fibroblastes, cellules endothéliales et cellules épithéliales) (Dranoff 2004; Carsuzaa *et al.* 2021). Chacune des cytokines impliquées dans la pathogénie de la PNS sera détaillée en insistant sur ses caractéristiques structurales, ses cellules sources, son ou ses récepteur(s), ses effets dans l'inflammation T2, et sur la cellule. Premièrement, parmi les alarmines, la TSLP, très probablement la première cytokine au sein de la cascade inflammatoire T2, sera étudiée, puis les autres alarmines seront décrites (IL-25 et IL-33). Deuxièmement, les cytokines T1, dont la réponse est axée sur la lutte contre les pathogènes viraux, seront abordées, car c'est le cœur du sujet de la première étude que nous avons menée dans le cadre de cette thèse visant à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous nous concentrerons sur les cytokines de la famille de l'IL-6 (IL-6 et OSM) puis sur une autre cytokine T1 ayant un effet important sur l'épithélium, l'IFN $\gamma$ . Troisièmement, les cytokines T2, qui régulent la régénération des tissus après une blessure, seront explicitées. En effet, bien que prépondérantes dans la PNS, elles seront abordées en conclusion de ce chapitre sur les cytokines pour faire le lien avec les biothérapies ayant l'AMM dans le traitement de la PNS depuis 2021, le dupilumab et le mépolizumab, décrites au sein du chapitre suivant (chapitre 2.2.). Nous commencerons par l'IL-4 et l'IL-13, car ce sont celles que nous avons étudiées pour la deuxième étude que nous avons menée dans le cadre de nos travaux sur les cytokines et l'épithélium. Ensuite l'IL-5 et l'IL-9 seront détaillées. Un tableau récapitulatif des cytokines est présenté en conclusion de ce chapitre (**Tableau 5**). Les cytokines T3, comprenant l'IL-17A et l'IL-22, dont les effets immunologiques sont dirigés contre les bactéries et les champignons extracellulaires (W. J. Fokkens *et al.* 2020), ne seront pas traitées, aucune n'ayant été étudiée dans le cadre de mes travaux de recherche.

#### a. Alarmines

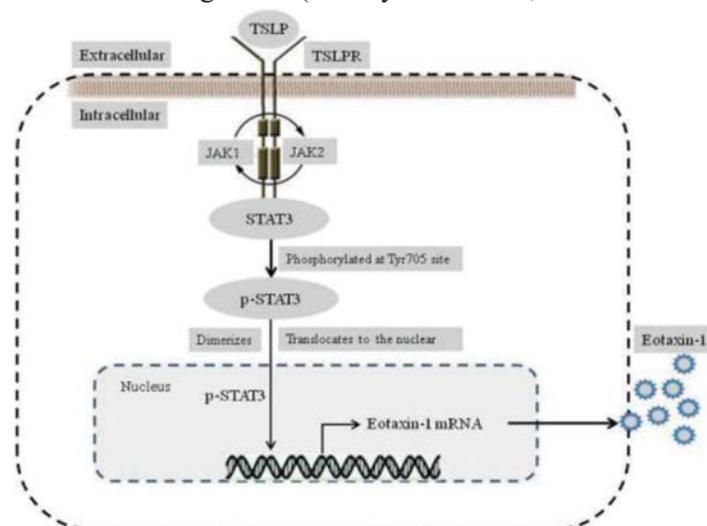
Les agents microbiens (bactéries, parasites ou virus) interagissent avec le système immunitaire par l'intermédiaire de récepteurs appartenant à la famille des TLR. Ceux-ci reconnaissent, comme signaux de danger, des motifs moléculaires issus des microorganismes et désignés sous le nom de PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Divers stress chimiques, mécaniques ou biologiques induisent invariablement la libération de facteurs cellulaires dont certains peuvent activer le processus inflammatoire et fonctionner comme autant de signaux de danger. Cette observation a conduit à proposer, dès 2006, une nouvelle catégorie de médiateurs solubles : les alarmines, qui constitueraient l'équivalent cellulaire des PAMPs (Barnay-Verdier, Maréchal, et Borde 2009). Parmi elles, une alarmine semble jouer un rôle clef, c'est la TSLP pour lequel un Ac thérapeutique existe et a l'AMM dans l'asthme, le tezepelumab. Mais deux autres alarmines ont fait la preuve de leur implication dans la PNS et seront détaillées : l'IL-25 et l'IL-33.

### **Lymphopoïétine stromale thymique (TSLP)**

*Structure* : La TSLP, analogue structural de l'IL-7, est une cytokine pro-inflammatoire de la famille des cytokines hématopoïétiques à chaînes courtes (famille de l'IL-2) (Quentmeier *et al.* 2001; Reche *et al.* 2001; Y.-J. Liu *et al.* 2007). Au sein de la famille de l'IL-2, on retrouve l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15, et l'IL-21.

*Source* : Chez l'Homme, la TSLP est produite en réponse à un stimulus (agression environnementale) par les cellules épithéliales de surface, comme la peau et les différentes muqueuses respiratoires et intestinales. En effet, la TSLP est fortement exprimée au niveau des épithéliums barrières, notamment au niveau de l'épiderme des patients atteints de DA (Soumelis *et al.* 2002), dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) des patients asthmatiques (Ying *et al.* 2005), dans les prélèvements nasosinusiens des patients atteints de rhinite allergique (RA) (Mou *et al.* 2009) et dans la cornée des patients atteints de kérato-conjonctivite atopique (Matsuda *et al.* 2010). La TSLP était détectée dans tous les échantillons de patients atteints de RA et l'expression de l'ARNm et de la protéine de la TSLP était augmentée de manière significative dans la muqueuse nasale des patients avec RA par rapport aux sujets contrôles. De plus, Mou *et al.* ont montré que la production de la TSLP était étroitement corrélée à l'IL-4 (la concentration de TSLP était corrélée positivement avec le niveau d'IL-4 dans la muqueuse nasale des patients avec RA) et à la gravité de la RA (la densité des marquages de la TSLP entre les patients présentant une RA légère ou sévère était significativement différente) (Mou *et al.* 2009). La TSLP est également exprimée dans les tissus sains au niveau du thymus et de l'épithélium tonsillaire (Watanabe *et al.* 2004) où elle joue un rôle dans l'induction des Treg et de la tolérance immunitaire.

*Récepteurs* : Son activation initie la signalisation intracellulaire en établissant un complexe avec son récepteur spécifique (Pandey *et al.* 2000; Park *et al.* 2000). Son récepteur est fait de 2 sous-unités, la sous-unité  $\gamma$  appelée TSLPR (codé par CRLF2) et la sous-unité  $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) qui, comme dans de nombreuses familles de récepteurs, a des chaînes communes avec d'autres récepteurs. Ainsi, les effets de l'IL-7 et de la TSLP sont médiés par l'interaction avec un complexe de récepteur hétéromérique composé d'une chaîne de liaison spécifique de l'IL-7 et de ses analogues structuraux (via la sous-unité  $\alpha$ ) et de la sous-unité  $\gamma$  commune ( $\gamma c$ ) à la famille des IL-2R (Di Santo, Kühn, et Müller 1995). L'IL-7R $\alpha$  est nécessaire à l'activation STAT5-dépendante de la voie signalisation de la TSLP (**Figure 18**). En revanche, la sous-unité  $\gamma$  n'est pas nécessaire mais renforce l'association TSLP-TSLPR (Pandey *et al.* 2000; Park *et al.* 2000). Le TSLPR est exprimé majoritairement par les cellules dendritiques primaires incluant les cellules de Langerhans (Pandey *et al.* 2000; Ebner *et al.* 2007).



**Figure 18. Voie de signalisation de la TSLP via le TSLPR (IL-7R $\alpha$  + TSLPR)**

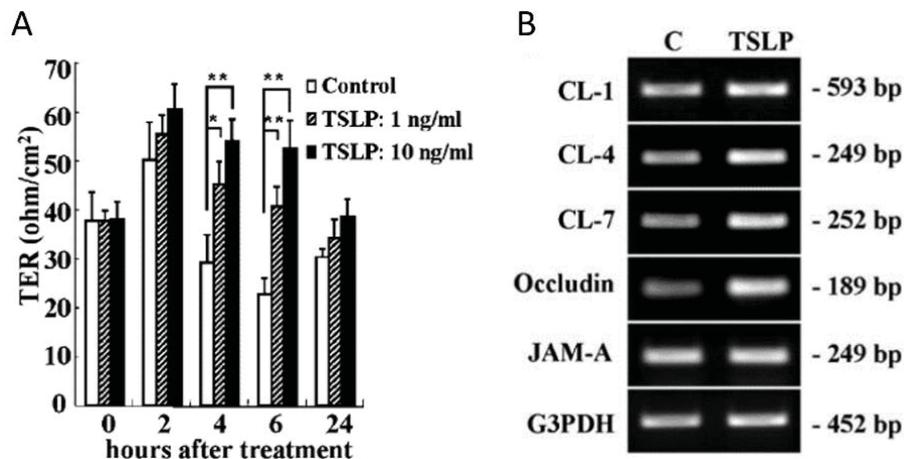
La TSLP se fixe sur son récepteur le TSLPR, activant la voie STAT-3.

Source : (W. W. Wang *et al.* 2018)

*Effets dans l'inflammation* : Les cellules épithéliales interagissent étroitement avec les cellules dendritiques *in situ* (Kato et Schleimer 2007). La stimulation par la TSLP induit une augmentation de la survie des cellules dendritiques ainsi que la sécrétion des chimiokines CCL17, CCL22, et CXCL8 (Soumelis *et al.* 2002). Ainsi, la TSLP régule l'immunité à la surface des barrières épithéliales par l'activation des cellules dendritiques (Soumelis *et al.* 2002), mastocytes, basophiles, EO et LT2 (Bell *et al.* 2013). En effet, la TSLP induit une différenciation T2 chez les LT naïfs, à l'origine d'une sécrétion de cytokines T2. Cependant dans le cas de la différenciation T induite par les cellules dendritiques activées par la TSLP, il s'agit d'un profil T2 inflammatoire car il est caractérisé par une sécrétion importante de TNF $\alpha$  et par l'absence de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Soumelis *et al.* 2002). La TSLP semble donc jouer un rôle central dans la physiopathologie de maladies T2 comme l'asthme, la DA, et la PNS en initiant la cascade inflammatoire (Verstraete *et al.* 2017).

*Effets sur l'épithélium* : Dans l'hypothèse d'un effet autocrine du TSLP sur la cellule épithéliale elle-même, Kamekura *et al.* ont étudié l'effet du TSLP sur les jonctions serrées *in vitro* sur des cultures de CENH (Figure 19). Ils ont mis en évidence une augmentation de la production de TSLP par les CENH après stimulation par du TLR2, du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ , une augmentation de la RETE à 4 h et à 6 h, ainsi qu'une augmentation des protéines de jonctions serrées à 6 h (claudin(CL)-1, CL-4, CL-7 et occludin) (Kamekura *et al.* 2010; 2009). La TSLP aurait un effet protecteur sur la barrière épithéliale par l'augmentation de la RETE assurant l'imperméabilité épithéliale face aux agents extérieurs. D'autres auteurs ont également étudié l'effet de différents stimuli sur la production de TSLP par les CENH et ont mis en évidence une augmentation de la production de TSLP lorsque les CENH sont exposées à des particules bactériennes de *Lactococcus lactis* (Yeh *et al.* 2013). Les auteurs travaillent sur des CENH issues de prélèvements muqueux sinusiens de patients atteints de PNS et leurs résultats supportent l'hypothèse que les CENH peuvent jouer un rôle immunomodulateur dans la réponse humorale spécifique (IgA et IgG) contre les virus ou les bactéries (Yeh *et al.* 2013).

*Anticorps monoclonal* : La TSLP a été évoquée comme une cible thérapeutique dans les maladies T2 (Huston et Liu 2006), et le tezepelumab, un AcM la prenant pour cible, existe depuis 2017 mais n'est commercialisé en France que depuis 2022 ([https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-20033\\_TEZSPIRE\\_PIC\\_INS\\_AvisDef\\_CT20033.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-20033_TEZSPIRE_PIC_INS_AvisDef_CT20033.pdf)). En parallèle, un essai clinique contrôlé contre placebo, randomisé de phase 3 (ECR 3), en double aveugle, en groupes parallèles, portant sur l'efficacité et la sécurité du tezepelumab chez des patients atteints de PNS est en cours, il s'agit de l'étude WAYPOINT pour laquelle les inclusions devraient être finies en 2024 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04851964>).



**Figure 19. Effets du TSLP sur l'épithélium nasal**

*Effets du TSLP sur la résistance électrique transépithéliale (A), et sur l'expression protéique des jonctions serrées (claudin-1, -4, -7 et occludin) (B).*

*Source : (Kamekura et al. 2009)*

## **Interleukine (IL)-25**

*Structure* : L'IL-25 est une alarmine de la famille des cytokines IL-17. La famille des cytokines IL-17 comprend six membres, IL-17A, -17B, -17C, -17D, -25 (anciennement IL-17E) et IL-17F, qui présentent des similitudes (Y.-H. Wang et Liu 2008; Kawaguchi *et al.* 2004).

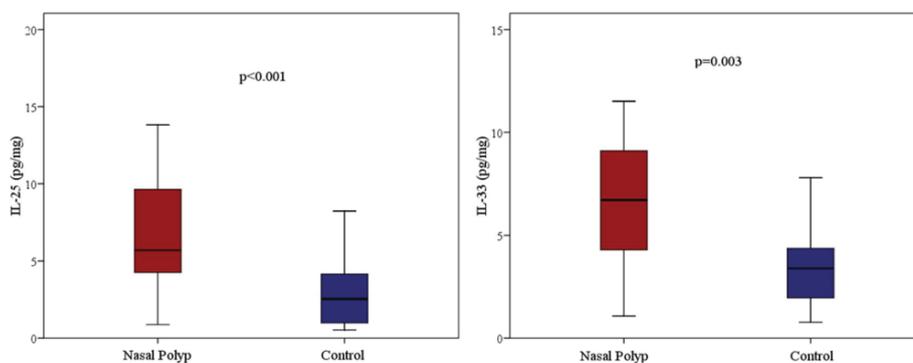
*Source* : L'IL-25 est principalement libérée par les cellules T2, les cellules épithéliales et les mastocytes, mais pas par les cellules T17 (Ciprandi *et al.* 2008; Molet *et al.* 2001).

*Récepteurs* : L'IL-25R a d'abord été identifié comme un récepteur de l'IL-17B (IL-17BR) (Y. Shi *et al.* 2000), également appelé IL-17R homologue 1 (IL-17Rh1) (J. Lee *et al.* 2001) et EVI27 (Tian *et al.* 2000). L'analyse de l'ARN et des protéines a montré l'existence de deux isoformes, l'une membranaire et l'autre soluble (Tian *et al.* 2000).

*Effets dans l'inflammation* : L'IL-25 jouerait un rôle dans l'asthme, la DA, et la PNS. Ses fonctions de cytokine des barrières épithéliales ont été largement démontrées (Hammad et Lambrecht 2015). Premièrement, dans l'asthme, l'IL-25 entraînerait la production d'EO ou de cytokines T2 dans le LBA et le tissu pulmonaire de modèles murins (Hurst *et al.* 2002; Fort *et al.* 2001). De plus, son blocage diminuerait la production de cytokines T2 dans les modèles animaux d'asthme (Ballantyne *et al.* 2007; Gregory *et al.* 2013). Ensuite, l'IL-25 jouerait un rôle chez les patients atteints de DA via l'induction de la réponse T2 et l'inhibition de la synthèse de la filaggrine, affectant ainsi la fonction de barrière cutanée (Hvid *et al.* 2011; Deleuran *et al.* 2012). D'un point de vue clinique, une corrélation entre l'augmentation des niveaux d'IL-25 et de moins bons résultats à la TDM ainsi qu'une augmentation des EO sériques chez les patients atteints de PNS a été rapportée (Lam *et al.* 2013). L'ensemble de ces résultats suggère que l'IL-25 sécrétée par l'épithélium nasal humain, et présente en grande quantité dans les polypes de patients atteints de PNS (**Figure 20**) joue un rôle crucial dans la pathogénie de la PNS.

*Effets sur l'épithélium* : Shin *et al.* ont montré que les cellules épithéliales de polypes humains et murins induits par l'ovalbumine et l'entérotoxine staphylococcique B ont une expression élevée d'IL-25 (H.-W. Shin *et al.* 2015). L'IL-25 favoriserait l'expression d'éotaxines par les CENH, participant ainsi à la migration des EO (G. Xu *et al.* 2010). Aucun effet sur le battement ciliaire ou la RETE n'a été décrit. En revanche un effet positif sur la réparation cellulaire a été mis en évidence via l'activation des macrophages M2 et des fibroblastes dans des modèles de diabète (S. Li *et al.* 2022).

*Anticorps monoclonal* : En 2021, XKH001, un AcM humanisé (IgG1) développé par Chen Dong *et al.*, devient le premier inhibiteur de l'IL-25 approuvé par la *food and drug administration* (FDA) pour débiter des essais cliniques, les premières études de phase 1 sont en cours mais elles ne concernent pas encore la PNS (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05128409>). En revanche, *in vivo* au sein de modèles murins, l'utilisation d'un anti-IL-25 a entraîné un effet anti-polype, probablement lié à l'inhibition des CLI2 et de la suppression du recrutement des cellules effectrices (EO et PNN) (H.-W. Shin *et al.* 2015).



**Figure 20. Niveau d'expression d'IL-25 et d'IL-33 dans les polypes de patients atteints de PNS.** Boîtes à moustache indiquant la distribution des niveaux d'IL-25 et d'IL-33 en pg/ml chez des patients atteints de PNS et des témoins.

Source : (Dogan, Sahin, et Yenisey 2019)

### **Interleukine (IL)-33**

*Structure* : L'IL-33 appartient à la famille de l'IL-1, et, comme les autres alarmines, elle est libérée à la suite d'une lésion tissulaire.

*Source* : Dans les poumons, les cellules musculaires lisses (CML) des voies respiratoires et les cellules épithéliales alvéolaires de type 2 expriment l'IL-33 (Molofsky, Savage, et Locksley 2015; Llop-Guevara *et al.* 2014).

*Récepteur* : L'IL-33 soluble se lie à l'IL-33R composé de deux sous-unités : ST2 (ou IL-1RL) et IL-1R $\alpha$ P (Chackerian *et al.* 2007). L'IL-33 passe par le récepteur ST2, qui est fortement exprimé sur les CIL2 et les LT2, ce qui explique son rôle dans l'allergie. L'IL-33R stimule la signalisation cellulaire NF $\kappa$ B et mitogen-activated protein (MAP)-kinase, et les formes solubles de la sous-unité ST2 de l'IL-33R inhibent la signalisation de l'IL-33R (Ohto-Ozaki *et al.* 2010).

*Effets dans l'inflammation* : L'IL-33 est le plus souvent caractérisée comme une cytokine épithéliale qui favorise la réponse T2 (Schmitz *et al.* 2005), mais des études récentes ont mis en évidence un rôle dans la réparation tissulaire (avec un risque de fibrose en cas de dysrégulation) et dans l'immunité contre les virus, les microbes et les cellules cancéreuses (Cook *et al.* 2023). Le blocage de l'IL-33 dans des cocultures en présence du *Pseudomonas Aeruginosa* a permis de rétablir l'autophagie des cellules épithéliales bronchiques humaines et d'atténuer l'activation des myofibroblastes (Banday *et al.* 2023). La concentration protéique d'IL-33 dans la PNS est élevée (**Figure 20**) et positivement corrélée au nombre de PNN et à l'expression de plusieurs marqueurs inflammatoires T1 et T17 (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-22) (Dogan, Sahin, et Yenisey 2019), suggérant un rôle dans la PNS par le biais du recrutement des PNN. Cependant, les niveaux protéiques d'IL-5 et la quantité d'EO étaient inversement corrélés aux niveaux d'IL-33. De la même façon l'IFN $\gamma$  diminue l'expression d'IL-33. En revanche, l'OSM augmente l'expression d'IL-33 dans les cellules épithéliales alvéolaires de poumons murins (Richards *et al.* 2016).

*Effets sur l'épithélium* : Bien que cette cytokine semble faire le lien entre plusieurs maladies respiratoires chroniques comme la BPCO, le SAS et la mucoviscidose (Hvidtfeldt *et al.* 2023), les effets directs de l'IL-33 sur ces CENH ne sont que très peu décrits pour le moment. Haenuki *et al.* ont révélé qu'*in vivo*, des souris KO pour l'IL-33 présentaient une réduction significative des niveaux d'IgE totales et des réponses liées aux IgE, ainsi que de l'infiltration par les EO et les basophiles dans la muqueuse nasale après une exposition à l'ambrosie (Haenuki *et al.* 2012). Ces résultats suggèrent son importance dans la pathogénie de la PNS où l'éosinophilie et les taux d'IgE totales sont des éléments majeurs.

*Anticorps monoclonal* : Un anti-IL-33 pourrait constituer une nouvelle stratégie de traitement pour cibler les PNN infiltrés dans la muqueuse des patients atteints de PNS (F. Botelho *et al.* 2020; Dogan, Sahin, et Yenisey 2019). Actuellement des anti-IL-33 sont en cours d'évaluation sur leur efficacité et leur sécurité dans les maladies T2 dont la PNS (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02170337> et <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03615040>).

## b. Cytokines T1

### Interleukine (IL)-6

*Structure* : L'IL-6 est une cytokine pléiotropique de 184 acides aminés (a.a.) dont l'ADN a été cloné en 1984. Elle est une des cytokines majeures de la famille de l'IL-6 (Kang, Tanaka, et Kishimoto 2015) et ses fonctions sont résumées dans la **figure 21**.

*Source* : Elle est produite par les LT, les LB, les monocytes, les macrophages, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les cellules mésenchymateuses et les adipocytes (Danielsen *et al.* 2006) en réponse à des micro-organismes et sous la stimulation d'autres cytokines, notamment l'IL-1 et le TNF $\alpha$ . Une étude récente a démontré que les macrophages et les cellules dendritiques étaient les principales sources d'IL-6 (Gubernatorova *et al.* 2018) mais dans la pathogénie de la PNS, ce seraient plutôt les fibroblastes qui synthétiseraient l'IL-6 (Carsuzaa *et al.* 2021).

*Récepteur* : L'IL-6 agit grâce à une liaison à deux molécules : IL6-R (aussi connue sous le nom de IL-6R $\alpha$ ) et gp130 (aussi connue sous le nom de IL-6R $\beta$ ) (Mihara *et al.* 2012). L'IL-6 peut également s'associer à son récepteur soluble (sIL-6R) permettant l'activation de cellules cibles qui n'expriment pas l'IL-6R membranaire. Ce processus décrit depuis longtemps a été nommé « trans-signaling » (S. Rose-John et 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.

*Effets dans l'inflammation* : L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire pleiotrope qui participerait à la réponse inflammatoire dans la PNS avec activation des LT et une induction de la sécrétion d'Ig par les LB (**Figure 21**). Une augmentation de l'expression de l'IL-6 au niveau des polypes par rapport aux tissus sains a déjà été mise en évidence (Danielsen *et al.* 2006; A. T. Peters *et al.* 2010). Dans la PNS, l'IL-6 est surexprimée (ARNm et protéine) dans les polypes nasaux par rapport à la muqueuse normale (A. T. Peters *et al.* 2010). L'IL-6 agit sur la régulation hématopoïétique, la régénération tissulaire, l'induction d'une inflammation chronique, le maintien d'une auto-immunité et la tumorigénèse (Gubernatorova *et al.* 2018). Gubernatorova *et al.* ont suggéré un rôle distinct de l'IL-6 en fonction de ses cellules productrices (macrophages ou cellules dendritiques). L'inactivation ciblée de l'IL-6 dans les macrophages a réduit les biomarqueurs clés de l'inflammation T2, notamment l'accumulation des EO dans les poumons et la production d'IgE. 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 *et al.* 2018). L'IL-6 produite par les macrophages participerait à la réponse T2 tandis que l'IL-6 produite par les cellules dendritiques jouerait un rôle important dans la réponse inflammatoire de type neutrophilique. Ces résultats sont en faveur d'un rôle actif de l'IL-6 dans le processus inflammatoire et surtout de son implication dans les 2 voies de signalisation inflammatoire à prédominance éosinophilique et neutrophilique et également de sa participation au remodelage tissulaire et à l'hyperréactivité bronchique (Gubernatorova *et al.* 2018).

*Effets sur l'épithélium* : L'IL-6 accélère la réparation après blessure *in vitro* avec un effet dose-réponse (Bequignon *et al.* 2020) mais ne semble pas avoir d'effet sur la différenciation ou sur le nombre de cellules au sein des zones blessées et non blessées. En effet, dans leur étude *in vitro* sur des CENH, Bequignon *et al.*, n'ont pas mis en évidence de différence significative de la proportion de cellules ciliées ou de cellules caliciformes (Bequignon *et al.* 2020). Enfin, les auteurs ont montré une augmentation de la FBC et de la longueur de l'onde métachrone (LOOM), 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 l'IL-6 (Bequignon *et al.* 2020). L'effet de l'IL-6 sur la perméabilité épithéliale et sur les jonctions serrées n'avait jamais été étudié, ce pourquoi nous avons décidé de mener un travail sur les IL de la famille de l'IL-6, dont l'IL-6 et l'OSM. Ce travail a été publié dans *IJMS* (Carsuzaa *et al.* 2023).

*Anticorps monoclonal* : Les AcM anti IL-6 sont développés en cancérologie et ne seront pas développés dans le cadre de cette thèse, aucun ne concernant la PNS, l'asthme ou la DA.

Organ & Tissue	Cell types	Effects
Immune system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD4 T cell</li> <li>• CD8 T cell</li> <li>• B cell</li> <li>• Plasmablast</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Th17 differentiation ↑, Treg differentiation ↓</li> <li>• Cytotoxic T cell differentiation ↑</li> <li>• Antibody production ↑</li> <li>• Survival ↑</li> </ul>
Liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatocyte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CRP ↑, SAA ↑, Hepcidin ↑, fibrinogen ↑</li> <li>• Albumin ↓</li> </ul>
Bone	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Synovial fibroblast</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RANKL ↑ → osteoclast differentiation ↑</li> <li>• VEGF ↑ → angiogenesis ↑, vascular permeability ↑</li> </ul>
Hematopoietic system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bone marrow cell</li> <li>• Megakaryocyte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differentiation ↑</li> <li>• Platelet release ↑</li> </ul>
Skin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dermal fibroblast</li> <li>• Keratinocyte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Collagen ↑, Myofibroblast differentiation ↑</li> <li>• Proliferation ↑</li> </ul>
Kidney	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesangial cell</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferation ↑</li> </ul>
Cardiovascular system	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vascular endothelial cell</li> <li>• Vascular smooth muscle cell</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activation ↑, Apoptosis ↑</li> <li>• Proliferation ↑</li> </ul>

### Figure 21. Fonctions de l'IL-6 et implications pathologiques

Activités pléiotropiques de l'IL-6 et implications pathologiques. L'IL-6 exerce une variété d'effets biologiques en agissant sur diverses cellules. La surexpression de l'IL-6 est pathologiquement impliquée dans l'état de diverses maladies, y compris les troubles immunologiques, la destruction des os et du cartilage, les réponses persistantes en phase aiguë et l'angiogenèse.

Abréviations : CRP, C-Reactive Protein; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor; SAA, Serum Amyloid A; RANKL, receptor activator of the NFκB ligand.

Source : (Kang, Tanaka, et Kishimoto 2015)

### **Oncostatin M (OSM)**

*Structure* : L'OSM est une glycoprotéine de 196 a.a. et 126kDa appartenant à la famille de l'IL-6.

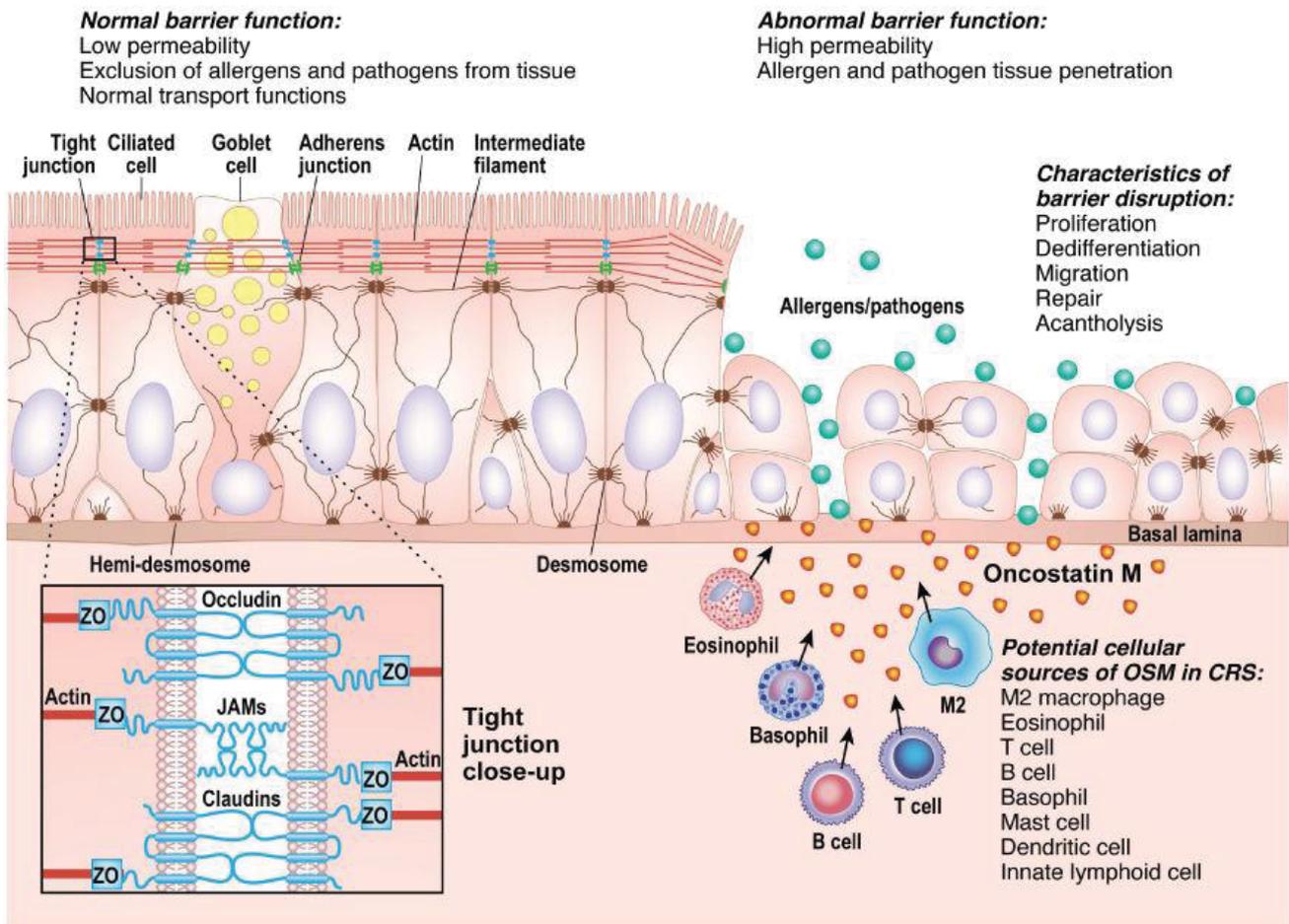
*Source* : L'OSM est produite les LT2, les EO, les PNN et les macrophages. Le détail de ses différentes sources cellulaires est présenté dans la **figure 22**.

*Récepteur* : Il a été démontré que l'OSM émet des signaux par l'intermédiaire de deux récepteurs : le récepteur de type 1 est un hétérodimère de Leukemia Inhibitory Factor Receptor (LIFR) et de la glycoprotéine 130 (gp130) et le récepteur de type 2 est un hétérodimère de la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'OSM (OSMR $\beta$ ) et de gp130. Il a été démontré que l'OSM est exprimé par de multiples types de cellules de la lignée hématopoïétique, mais on ne sait pas s'il est exprimé par l'épithélium, les fibroblastes ou les muscles lisses, qui sont toutes des cellules exprimant les différentes formes du récepteur de l'OSM (Scaffidi *et al.* 2002).

*Effets dans l'inflammation* : L'OSM joue un rôle important dans la réparation et l'homéostasie épithéliale (H. Wang *et al.* 2018; Pothoven *et al.* 2017; Morse *et al.* 2019). En effet, l'OSM est un puissant inducteur de la signalisation gp130 qui conduit à l'expression de gènes cibles pro-inflammatoires et au remodelage de la MEC (Richards 2013; West, Owens, et Hegazy 2018). La surexpression de l'OSM ou l'administration de la protéine OSM entraînaient un phénotype T2 (éosinophilie et production de cytokines IL-4, -5 et -13) (Mozaffarian *et al.* 2008; Fritz *et al.* 2011; F. M. Botelho *et al.* 2013). L'OSM, bien qu'elle soit moins connue que l'IL-6, a des effets sur les tissus souvent plus puissants que cette dernière (Boniface *et al.* 2007) (**Figure 22**). Des études utilisant un épiderme reconstitué ont montré que l'OSM diminuait l'expression de la filaggrine, une molécule importante pour la fonction de barrière, ce qui suggère que l'OSM pourrait contribuer au dysfonctionnement de la barrière épithéliale cutanée (Gazel *et al.* 2006). L'OSM cible les cellules épithéliales au niveau cutané, où il agit sur les kératinocytes, en inhibant la différenciation cellulaire et en induisant des chimiokines et des peptides antimicrobiens (Boniface *et al.* 2007). Il a également été démontré que l'OSM diminue la fonction de barrière des cellules endothéliales (Takata *et al.* 2008). L'OSM joue également un rôle sur les fibroblastes tissulaires et joue un rôle important dans des pathologies associées à la fibrose (sclérose systémique, polyarthrite rhumatoïde et fibrose pulmonaire interstitielle). L'OSM peut avoir une action pro- ou antifibrotique selon le modèle (Hanlon *et al.* 2019; Mozaffarian *et al.* 2008; Hasegawa *et al.* 1998). Enfin, l'OSM (protéine et ARNm) est surexprimé dans les polypes nasaux par rapport à la muqueuse nasale non polypoïde dans la PNS (Pothoven *et al.* 2015). Dans la PNS, sur les fibroblastes, l'OSM contrecarre l'action pro-fibrotique du TGF- $\beta$ 1, en inhibant la différenciation des myofibroblastes et la production de composants de la MEC (Carsuzaa *et al.* 2022). L'OSM pourrait donc agir à la fois sur les composants épithéliaux et fibroblastiques des polypes.

*Effets sur l'épithélium* : Sur des CENH cultivées issues de polypes nasaux, l'OSM provoque une altération de la barrière épithéliale, mise en évidence par une diminution de la RETE et une augmentation de la perméabilité (Pothoven *et al.* 2015). En revanche, l'effet de l'OSM sur la CMC, la réparation après blessure et les jonctions serrées ne sont pas connus. Enfin, très récemment, un lien entre OSM et TSLP a été mis en évidence par Wang *et al.* L'OSM augmenterait l'expression de l'IL-4R $\alpha$  et agirait en synergie avec l'IL-4 pour induire la synthèse et la libération de TSLP dans les CENH (B.-F. Wang *et al.* 2023). Ces résultats suggèrent que l'OSM pourrait induire à la fois des modifications directes de l'épithélium nasal et la synthèse de la TSLP. L'OSM devient ainsi, une cible thérapeutique majeure dans la course au développement de nouveaux AcM pour traiter les maladies T2.

*Anticorps monoclonal* : GSK315234 est un AcM humanisé dirigé contre l'OSM qui a été testé dans des essais de phase 2 dans la polyarthrite rhumatoïde (Choy *et al.* 2013) et pour lequel les résultats sont satisfaisants. D'autres études sont en cours (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00674635> et [NCT04151225](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04151225)) mais aucun concernant la PNS. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer l'effet de l'OSM sur l'épithélium nasal pour déterminer si cette cytokine pouvait devenir une cible thérapeutique d'intérêt.



**Figure 22. Modèle de l'OSM dans les dysfonctions épithéliales conduisant à la PNS**

L'épithélium des voies respiratoires assure une fonction de barrière grâce à un réseau intercellulaire complexe de jonctions permettant l'adhésion entre les cellules mais aussi aux cytosquelettes, illustré sur la partie gauche de la figure. L'altération de la fonction de barrière épithéliale, illustrée sur la partie droite de la figure, peut survenir dans les suites d'une exposition à l'OSM et conduire à un état d'inflammation chronique en raison de l'exposition tissulaire aux agents de l'environnement qui n'auraient normalement pas accès aux tissus.

Source : (Pothoven et al. 2015)

## **Interféron (IFN) $\gamma$**

*Structure* : L'IFN $\gamma$  est constitué d'un noyau de six hélices  $\alpha$  et d'une séquence dépliée étendue dans la région C-terminale (Gray et Goeddel 1982). Il s'agit d'une cytokine soluble dimérisée appartenant aux IFN de type II.

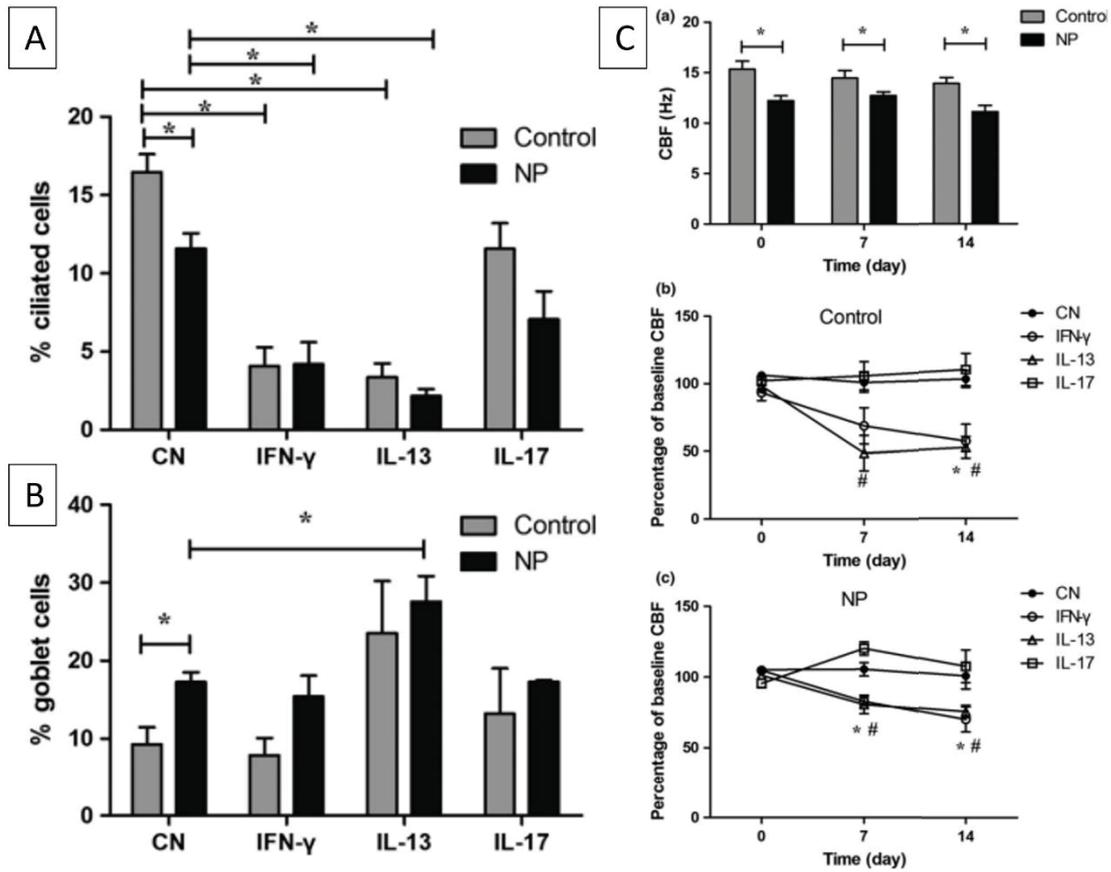
*Source* : L'IFN $\gamma$  est produit par le sous-ensemble lymphocytaire T1.

*Récepteur* : Le récepteur à l'IFN $\gamma$  est un récepteur hétérodimérique composé du récepteur 1 de l'IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$ R1) et du récepteur 2 (IFN $\gamma$ R2). La liaison de l'IFN $\gamma$  à l'IFN $\gamma$ R active la voie Janus Kinase (JAK)-STAT. L'activation de la voie JAK-STAT induit une régulation à la hausse des gènes stimulés par l'IFN, y compris le CMH II (X. Hu et Ivashkiv 2009). Les cultures épithéliales non stimulées dérivées de patients sains et atteints de PNS exprimaient l'IFN $\gamma$ R $\alpha$  (J. Jiao *et al.* 2016).

*Effets dans l'inflammation* : Des niveaux élevés d'IFN- $\gamma$  et d'EO ont été mis en évidence dans les sécrétions nasales et la muqueuse nasosinusienne chez des patients atteints de PNS (Jo *et al.* 2023), mais ces résultats ne sont pas consistants. En effet, Oyer *et al.* ont prélevé des fragments muqueux sinusiens et des sécrétions au niveau du méat moyen pour mesurer les niveaux des différentes IL et de l'IFN $\gamma$ , et le niveau de ce dernier était en dehors des seuils de détection (Oyer *et al.* 2013). Dans une autre étude, les auteurs ont prélevé la muqueuse de l'ethmoïde antérieur chez des patients atteints de PNS et des sujets contrôles. Ils ont ainsi pu montrer que l'expression de l'IFN $\gamma$  était significativement plus élevée que celle de l'IL-10 et de l'IL-4 dans les LT infiltrant la muqueuse lorsqu'ils sont stimulés avec le superAg du staphylocoque (K.-S. Cho *et al.* 2010). Les LT producteurs d'IFN $\gamma$  pourraient donc jouer un rôle important dans la PNS lorsque l'inflammation chronique est induite par le superAg du staphylocoque (K.-S. Cho *et al.* 2010).

*Effets sur l'épithélium* : Parmi les différents effets de l'IFN $\gamma$  sur l'épithélium, Soyka *et al.* ont montré une diminution *in vitro* de la RETE au sein de cultures de CENH issues de polypes ou de muqueuse saine (Soyka *et al.* 2012). Ensuite, l'association de doses élevées d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  serait inhibitrice de la réparation épithéliale (Schäffer *et al.* 2002). L'IFN $\gamma$  est également impliqué dans le dysfonctionnement mucociliaire des voies aériennes par la réduction de la proportion de cellules ciliées (**Figure 23**) (J. Jiao *et al.* 2016). L'IFN $\gamma$  semble pouvoir induire la TEM dans les cellules épithéliales nasales également (J. Jiao *et al.* 2016). Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence *in vitro* une diminution significative de la fréquence de battement ciliaire (FBC) lorsque les CENH étaient exposées à l'IFN $\gamma$  pendant une durée totale de 14J (**Figure 23**) (J. Jiao *et al.* 2016). En revanche, les résultats sont paradoxaux en fonction de la concentration testée (0,1, 1 et 10 ng/ml). Alors que les concentrations les plus faibles ont entraîné une diminution de la FBC, une augmentation de 6% a été observée à la plus forte concentration d'IFN $\gamma$  (10ng/ml).

*Anticorps monoclonal* : Des AcM dirigés contre l'IFN $\gamma$  (fontolizumab et AMG811) ont été développés. Le fontolizumab (HuZAF) est un AcM humanisé qui se lie à l'IFN $\gamma$  et inhibe l'expression des gènes qu'il régule. Le fontolizumab est étudié pour le traitement des maladies auto-immunes, telles que la maladie de Crohn, le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques. L'AMG811 est un AcM humain qui se lie à l'IFN $\gamma$  et le neutralise, il est en cours d'évaluation par Amgen. Aucun n'est testé dans la PNS à ce jour dans des ECR de phase 1, 2 ou 3.



**Figure 23 : Effets de l'IFN $\gamma$  sur la différenciation mucociliaire**

(A) effets de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-13 et de l'IL-17 sur la proportion de cellules ciliées entre patients contrôles (gris clair) et patients avec une PNS (noir), (B) sur la proportion de cellules sécrétoires) et (C) sur la fréquence de battement ciliaire (FBC) au cours du temps pendant 14J de cultures, en valeur absolue en Hertz (a) et en proportion par rapport à l'état de base chez les patients contrôles (b) et atteints de PNS (c).

Abréviations : CBF, Fréquence du battement ciliaire ; CN, Tissu nasal contrôlé ; NP, polypes nasaux

Source : (J. Jiao et al. 2016)

### c. Cytokines T2

L'inflammation T2 est associée à un remodelage tissulaire, associant œdème polypoïde, dépôt de fibrine et défaillance de la fonction de barrière de l'épithélium, elle dépend directement de la signature cytokinique T2. Une problématique encore non élucidée persiste : est-ce que les facteurs associés à la défaillance de la barrière épithéliale sont également ceux permettant la pénétration initiale par l'aérocontaminant issu de l'environnement ? La défaillance de la fonction de barrière expose l'épithélium à une plus grande stimulation antigénique et donc plus d'inflammation, mais l'inflammation endommage elle aussi la barrière épithéliale, favorisant ainsi la chronicité (W. J. Fokkens *et al.* 2020).

#### **Interleukine (IL)-4**

*Structure* : Le gène humain de l'IL-4 est situé sur le chromosome 5q31, dans le même groupe de 3000 kilobases (1 kb correspond à une longueur de 1000 bases d'ARN en biologie moléculaire) de gènes codant pour l'IL-3, l'IL-13, l'IL-5, l'IL-9 et le GM-CSF. Le gène IL-4 se trouve à seulement 12 kb en aval du gène IL-13 et est positionné dans la même orientation, ce qui indique qu'une duplication du gène a eu lieu au cours de l'évolution.

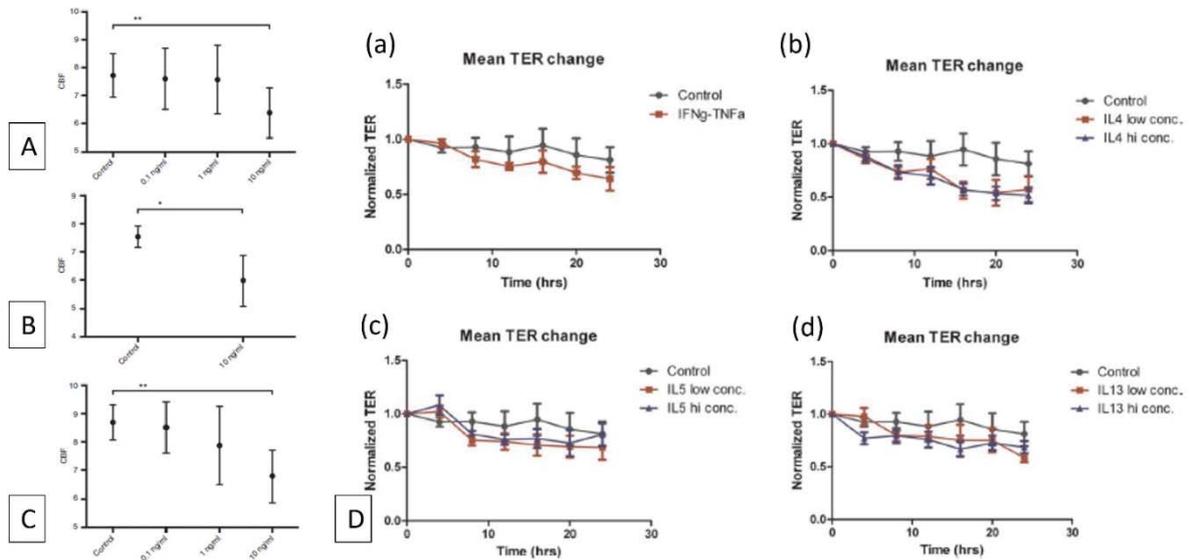
*Source* : Les principales sources cellulaires d'IL-4 et d'IL-13 sont les cellules T CD4, les basophiles, les EO, les mastocytes, les LNK stimulées et les CIL2 (Mosmann *et al.* 2005; Yoshimoto et Paul 1994; Nonaka *et al.* 1995; Moro *et al.* 2010; Neill *et al.* 2010; Saenz *et al.* 2010).

*Récepteur* : La signalisation IL-4/IL-13 est médiée par l'IL-4R de type II sur les cellules d'origine non hématopoïétique, qui se lie à la fois à l'IL-4 et à l'IL-13 et se compose de l'IL-4R $\alpha$  et de l'IL-13R $\alpha$ 1 (LaPorte *et al.* 2008). Lorsque l'IL-4 se lie à l'IL-4R $\alpha$ , le complexe IL-4/IL-4R $\alpha$  se lie à une chaîne réceptrice secondaire, soit l'IL-2R $\gamma$ c ( $\gamma$ c), soit l'IL-13R $\alpha$ 1. L'IL-13 se lie à son tour à l'IL-13R $\alpha$ 1, puis le complexe s'associe à l'IL-4R $\alpha$  s'il n'est pas complexé avec l'IL-4 (Junttila 2018). L'IL-4R $\alpha$  joue un rôle clé dans l'inflammation des voies respiratoires et le remodelage des tissus en se liant directement à l'IL-4 ou en renforçant l'affinité de l'IL-13 avec l'IL-13R $\alpha$ 1 (Ingram et Kraft 2012; Marsha Wills-Karp et Finkelman 2008). L'IL-4R $\alpha$  est exprimée dans les glandes sous-muqueuses des témoins et dans les polypes nasaux des patients atteints de PNS (Y. Zhang *et al.* 2019).

*Effets dans l'inflammation* : L'IL-4 est le régulateur des fonctions lymphocytaires (différenciation T2 et commutation isotypique (IgG1 vers IgE)), tandis que l'IL-13 est une cytokine effectrice qui régule la contraction des muscles lisses et la production de mucus par l'épithélium des voies aériennes dans l'asthme (M. Wills-Karp *et al.* 1998).

*Effets sur l'épithélium* : L'IL-4 perturbe l'expression et la localisation des protéines de JS (ZO-1 et occludine) (S.-N. Lee *et al.* 2019), mais les résultats dans la littérature ne sont pas cohérents. Lee *et al.* ont mis en évidence une réorganisation du cytosquelette d'actine après exposition à l'IL-4 et l'IL-13, mais Wise *et al.* n'ont trouvé aucun changement dans l'expression de ZO-1 après exposition à l'IL-4 ou à l'IL-13, bien qu'ils aient mis en évidence une perméabilité épithéliale accrue (Wise *et al.* 2014). L'IL-4 et l'IL-13 diminuent la RETE des CENH *in vitro*, probablement en régulant à la baisse l'expression de certaines des protéines de JS (Wise *et al.* 2014; Ahdieh, Vandebos, et Youakim 2001) (**Figure 24**). L'IL-4 diminue également la vitesse de fermeture de blessure *in vitro*, alors que les résultats ne sont pas significatifs avec l'IL-13 (Wise *et al.* 2013). L'IL-4 induit également l'expression du gène de la mucine et la métaplasie des cellules sécrétoires *in vivo* (Dabbagh *et al.* 1999). Tout comme l'IL-13, l'IL-4 diminue à la fois l'expression du gène MUC5AC et la sécrétion de mucine *in vitro* (Jayawickreme *et al.* 1999; C.-H. Kim *et al.* 2002). Tous ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'IL-4 et l'IL-13 altèrent les fonctions épithéliales et contribuent à la pathogénie de la PNS.

*Anticorps monoclonal* : l'effet de l'AcM dirigé contre l'IL-4 (dupilumab) sera détaillé dans le chapitre 2.2.



**Figure 24. Effets de l'IL-4 et de l'IL-13 sur la FBC et la RETE.**

Etude de l'effet de l'IL-4 (A), de l'IL-13 (B), et de l'IL-4 avec l'IL-13 (C) sur la fréquence de battement ciliaire. Les concentrations sont en ng/ml et les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Puis en (D), l'évaluation de la résistance électrique transépithéliale selon différentes stimulations,  $IFN\gamma$ - $TNF\alpha$  (a), IL-4 (b), IL-5 (c) et l'IL-13 (d).

Source : (A), (B) et (C) (Grosse-Onnebrink et al. 2016) ; (D) (Wise et al. 2014)

### Interleukine (IL)-13

**Structure :** L'IL-13 se compose de 132 a.a. et a une masse moléculaire de 12 kilo daltons (kDa). Le gène humain de l'IL-13 est situé sur le chromosome 5q31. Bien que la protéine IL-13 n'ait que 25% d'homologie avec l'IL-4, elles partagent de nombreuses similitudes structurales et fonctionnelles en raison de l'IL-4 $R\alpha$  (Zurawski et de Vries 1994).

**Source :** L'IL-13 est une cytokine sécrétée par les LT2, les LB, les LNK, les EO, les mastocytes, les basophiles, et les monocytes (Rael et Lockey 2011). Les détails concernant l'IL-13R ont été décrits dans la section dédiée à l'IL-4 en raison de leur sous-unité  $\alpha$  commune, l'IL4- $R\alpha$ .

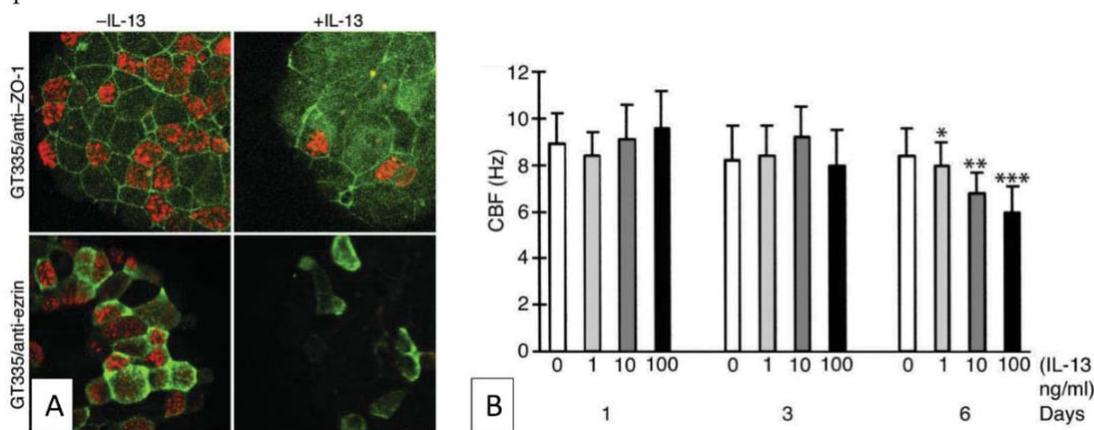
**Récepteur :** Le récepteur de l'IL-13 (IL-13R) est un complexe formé de l'IL-4 $R\alpha$  et de l'IL-13 $R\alpha 1$  codée par le gène IL13RA1 situé sur le chromosome X. L'IL-13 $R\alpha 1$  seule a une faible affinité pour l'IL-13, mais une fois le complexe formé avec l'IL-4 $R\alpha$ , l'affinité augmente, permettant la transmission du signal via la phosphorylation JAK1 et Tyk2.

**Effets dans l'inflammation :** Chez l'Homme, le niveau d'expression de l'IL-13 est fortement corrélé à l'expression de la plupart des gènes dont l'expression est différente entre sujets asthmatiques et sujets témoins, ce qui suggère que l'IL-13 est l'un des principaux moteurs du dysfonctionnement de l'épithélium des voies aériennes supérieures dans l'asthme. Au sein des modèles murins, la surexpression transgénique de l'IL-13 seule, dans les voies aériennes, déclenche la plupart des caractéristiques de l'asthme, notamment l'hyperréactivité des voies aériennes, la surproduction de mucus, l'inflammation à EO et la fibrose sous-épithéliale confirmant le rôle prépondérant et pathologique de l'IL-13 (Zhu et al. 1999). Les effets de l'IL-13 sur les voies respiratoires résultent de réponses se produisant dans plusieurs types de cellules, notamment les EO, les fibroblastes, les LT, les LB, les CML des voies respiratoires et les cellules épithéliales des voies respiratoires. L'IL-13 est également associée au développement des polypes et peut déclencher le recrutement de cellules inflammatoires et l'activation des EO (de Vries 1998; Zhu et al. 1999). L'IL-13 induit une métaplasie mucipare et une hyperréactivité des voies aériennes *in vivo* sur des souris génétiquement modifiées (Kuperman et al. 2002).

*Effets sur l'épithélium* : Le remodelage cellulaire de l'épithélium des voies aériennes humaines médié par l'IL-13 a été étudié *in vitro* à l'aide de modèles de culture primaire en IAL. L'IL-13 diminue la FBC tout en augmentant la proportion de cellules sécrétoires, et réduit l'adhésion intercellulaire *in vitro* (S.-N. Lee *et al.* 2019; Ordovas-Montanes *et al.* 2018). Les auteurs ont ainsi pu démontrer que l'IL-13 déséquilibre fortement le processus de différenciation, avec pour résultat, significativement plus de cellules à mucus positives au MUC5AC (MUC5AC<sup>+</sup>) et moins de cellules ciliées (Turner *et al.* 2011; Laoukili *et al.* 2001) (**Figure 25**). Cette transdifférenciation (cellules ciliées en cellule sécrétoires) a été également confirmée par d'autres auteurs (Gomperts *et al.* 2007). Cependant, la transition des cellules ciliées vers les cellules à mucus n'explique probablement pas à elle seule l'apparition rapide (<48 h) d'un si grand nombre de cellules MUC5AC<sup>+</sup> (sans caractéristique de cellules ciliées) après stimulation par l'IL-13 (Laoukili *et al.* 2001).

Les modifications du mucus induites par l'IL-13 pourraient participer à la modification de la FBC précédemment décrites (Ordovas-Montanes *et al.* 2018). En effet, les propriétés viscoélastiques du mucus des voies respiratoires sont déterminées en partie par les mucines entrant dans sa composition, MUC5B et MUC5AC (Thornton, Rousseau, et McGuckin 2008). Or, des données *in vivo* et *in vitro* indiquent que l'IL-13 augmente l'expression du gène MUC5AC tout en diminuant l'expression du gène MUC5B (Woodruff *et al.* 2009; Poole *et al.* 2014; Bonser *et al.* 2016). En outre, une étude récente a démontré que les expectorations isolées de sujets sains présentaient un ratio plus élevé de mucine MUC5B par rapport à la mucine MUC5AC, alors que chez les patients asthmatiques, c'était l'inverse (Lachowicz-Scroggins *et al.* 2016). Cette étude a également montré une corrélation positive entre les taux d'EO et le niveau du rapport MUC5AC/MUC5B dans les expectorations de patients asthmatiques (Lachowicz-Scroggins *et al.* 2016). Une autre étude récente portant sur des cultures de CEH des voies aériennes en IAL a révélé que l'IL-13 réduisait l'efficacité du transport mucociliaire par fixation du mucus à l'épithélium (effet direct de MUC5AC), sans affecter la FBC (Bonser *et al.* 2016). Enfin, les effets de l'IL-13 sur la RETE ne sont pas significatifs sur les CENH (Wise *et al.* 2014). A ce stade, des études plus complètes sont nécessaires pour déterminer comment l'IL-13 impacte les CENH et c'est pourquoi nous avons étudié les effets de l'IL-4 et de l'IL-13 en l'absence et en présence de leurs AcM *in vitro* dans ce travail de thèse.

*Anticorps monoclonal* : l'effet de l'AcM dirigé contre l'IL-13 (dupilumab) sera détaillé dans le chapitre 2.2.



**Figure 25. Effets de l'IL-13 sur la différenciation mucociliaire et la FBC**

(A) l'IL-13 affecte la différenciation mucociliaire avec une diminution de la proportion de cellules ciliées (marquage GT335 en rouge), et une diminution de l'expression d'ezrin (vert) et de ZO-1 (vert) ; (B) Au 6<sup>ème</sup> jour, une diminution de la FBC concentration dépendante a été mise en évidence avec une exposition des CENH à l'IL-13 1, 10 ou 100ng/mL. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Le test t de Student a été utilisé pour comparer les cellules stimulées par l'IL-13 et les témoins au même temps d'incubation. Une valeur de  $P < 0,05$  a été acceptée comme statistiquement significative (\*  $P < 0,02$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,0001$ ). Source : (A) (Laoukili *et al.* 2001) ; (B) (Wise *et al.* 2014)

### **Interleukine (IL)-5**

*Structure* : L'IL-5 est une glycoprotéine dimérique avec un motif en faisceau à quatre hélices (Kusano *et al.* 2012).

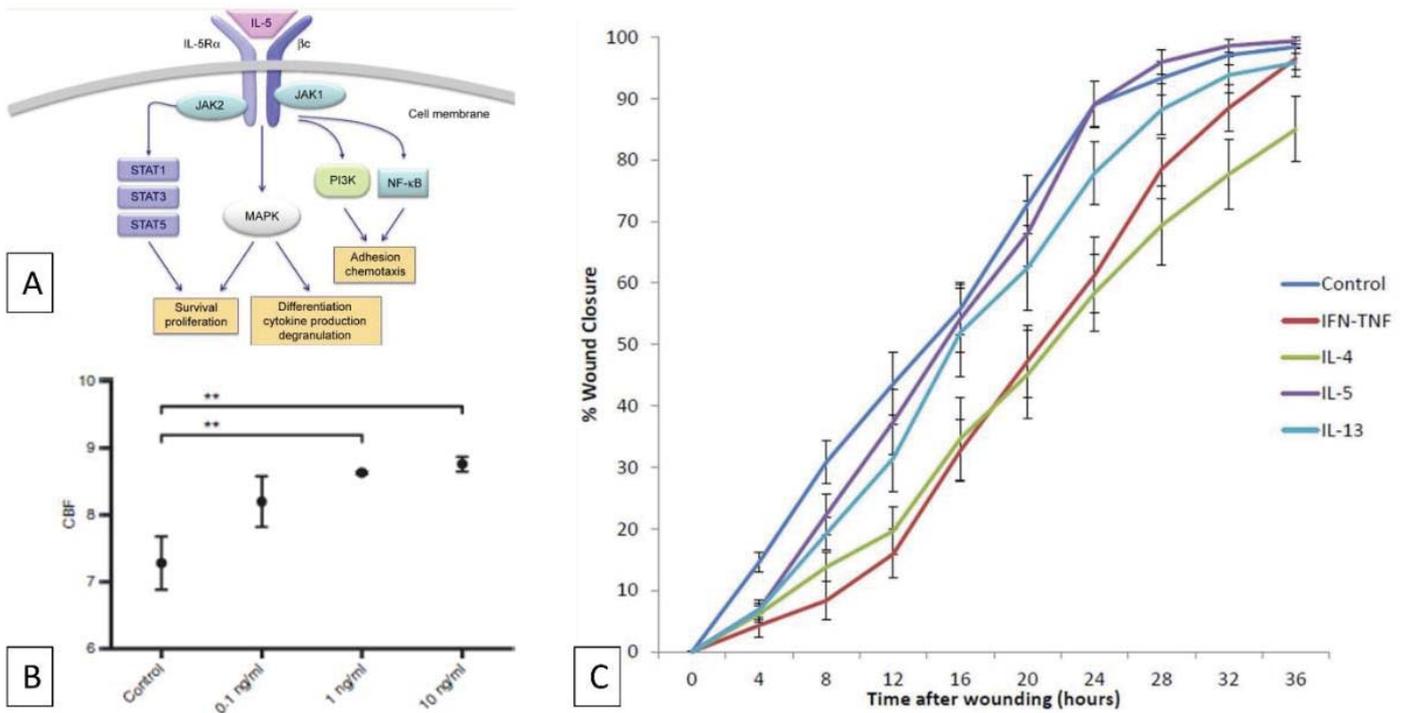
*Source* : Au sein de l'épithélium respiratoire, les principales sources cellulaires d'IL-5 sont les LT2, les LNK, les CIL2, les mastocytes et les EO eux-mêmes (S. Yu *et al.* 2014; Woodruff *et al.* 2009; Hogan *et al.* 2008). Un des éléments majeurs dans la pathogénie de la PNS est que les EO sont la principale source d'IL-5 et sont donc capables d'autoentretenir la réaction inflammatoire (boucle autocrine d'activation et de survie des EO au sein des polypes) (C. Bachert *et al.* 1998).

*Récepteur* : Les effets cellulaires de l'IL-5 sont médiés par sa liaison à un récepteur membranaire comprenant une sous-unité  $\alpha$  spécifique du ligand (IL-5R $\alpha$ ) et une sous-unité  $\beta$  commune ( $\beta c$ ) de signalisation non spécifique, qui interagit également via un domaine extracellulaire commun avec deux autres cytokines (IL-3 et le GM-CSF) (Rossjohn *et al.* 2000; Murphy et Young 2006). La liaison à haute affinité de l'IL-5 à l'IL-5R $\alpha$  est suivie par la ligature de ce complexe IL-5/IL-5R $\alpha$  activé à la sous-unité  $\beta c$ , qui déclenche la transduction du signal via la dimérisation de son domaine cytoplasmique (Ishino *et al.* 2008; Johanson *et al.* 1995). Les voies de signalisation activées impliquent plusieurs enzymes de transduction dont les JAK (Molfino *et al.* 2012) (**Figure 26A**).

*Effets dans l'inflammation* : L'IL-5 a été rapidement mise en avant comme une des cytokines clés dans la pathogénie de la PNS capable d'induire une accumulation majoritaire d'EO au sein des polypes (C. Bachert *et al.* 1997; Rudack, Stoll, et Bachert 1998). 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 (Tomassen *et al.* 2016; Claus Bachert, Zhang, et Gevaert 2015). Le taux d'IL-5 serait également plus élevé au niveau de la muqueuse de patients présentant des formes de PNS récidivantes en comparaison à des formes non récidivantes (Huriyati *et al.* 2019). En réponse à une provocation allergénique, un patient atopique répond par une capacité accrue de production d'EO, et cet effet est associé à des concentrations plus élevées d'ARNm d'IL-5 chez les sujets asthmatiques, par rapport aux contrôles (Wood *et al.* 2002). L'action stimulante de l'IL-5 sur la différenciation des EO agit au niveau des voies respiratoires comme au sein de la moelle osseuse (Dorman *et al.* 2004). L'IL-5 agit en synergie avec de puissantes chimiokines des EO, les éotaxines 1, 2 et 3, pour déclencher l'hyperréactivité bronchique (Fulkerson et Rothenberg 2013). L'IL-5 et les éotaxines coopèrent pour favoriser l'accumulation d'EO dans les voies respiratoires, en particulier pendant les exacerbations de l'asthme, et cet effet dépend au moins en partie de l'inhibition de l'apoptose des EO induite par l'IL-5 (J. Xu *et al.* 2007; Ilmarinen, Moilanen, et Kankaanranta 2014). L'IL-5 joue également un rôle pathogène essentiel dans l'asthme non allergique (Brusselle, Maes, et Bracke 2013).

*Effets sur l'épithélium* : Concernant l'interaction entre IL-5 et épithélium, une augmentation dose-dépendante de la FBC avec une augmentation maximale de la FBC de 20% a été mise en évidence (**Figure 26B**) (Grosse-Onnebrink *et al.* 2016). De plus, les capacités de réparation épithéliale sont modifiées en présence d'IL-5. En effet, le pourcentage de fermeture des blessures au sein des cultures de CENH exposées à l'IL-5 n'était pas significativement différent du contrôle (milieu de culture seulement) mais le pourcentage de fermeture des blessures exposées à l'IL-5 était plus élevé que celui des blessures exposées à l'IFN $\gamma$ -TNF $\alpha$  ( $p=0,023$ ) et à l'IL-4 ( $p=0,005$ ) (**Figure 26C**) (Wise *et al.* 2013). Aucune donnée sur la RETE de CENH exposées à des concentrations variables d'IL-5 n'existe dans la littérature à notre connaissance. Pour conclure, d'une part l'IL-5 joue un rôle clé dans la différenciation, la survie, la migration et l'activation des EO ; d'autre part, elle induit l'activation, la prolifération et la différenciation des LB ; et enfin, elle agit directement sur la cellule épithéliale en modifiant la FBC sans effet sur la réparation.

*Anticorps monoclonal* : l'effet des AcM dirigés contre l'IL-5 ou l'IL-5R (mépilizumab, benralizumab et reslizumab) sera détaillé dans le chapitre 2.2.



### Figure 26. Voies de signalisation du complexe IL-5/IL-5R et effets sur l'épithélium

L'IL5 augmente la FBC (B) mais n'a pas d'effet sur la réparation tissulaire après blessure (C). Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards à la moyenne.

Abréviations : JAK, Janus Kinase ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase ; NF $\kappa$ B, Nuclear Factor ; MAPK, Mitogen-activated protein kinase ; CBF, Fréquence du battement ciliaire.

Source : (A) (Molfino et al. 2012) (B) (Grosse-Onnebrink et al. 2016) (C) (Wise et al. 2013)

## **Interleukine (IL)-9**

*Structure* : L'IL-9 a d'abord été caractérisée comme un facteur de croissance des LT et des mastocytes (le P40) (Hültner *et al.* 1990), puis un peptide de 14 kDa codant pour une protéine de 144 a.a. a été proposé, rapidement caractérisé comme une cytokine T2 (Gessner, Blum, et Röllinghoff 1993). Le gène humain de l'IL-9 est situé sur le chromosome 5 à proximité des gènes de l'IL-5, -4 et -13 (Mock *et al.* 1990).

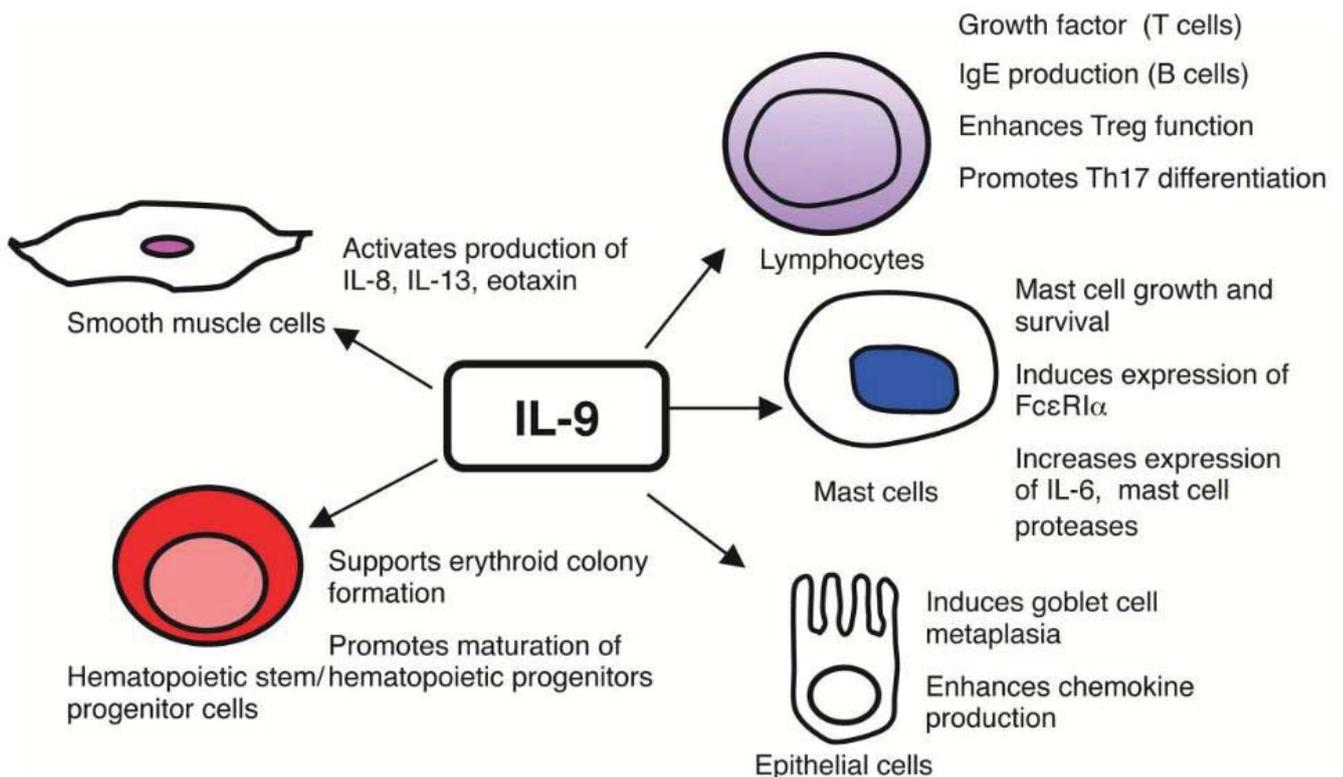
*Source* : L'IL-9 est une cytokine pleiotrope dont la source principale est les LT2 (T2 et T17) et les mastocytes (Schmitt *et al.* 1989; Nowak *et al.* 2009; Elyaman *et al.* 2009). Il a été mis en évidence que le TGF $\beta$  et l'IL-4 augmentaient la production d'IL-9 par les LT activés à l'inverse de l'IFN $\gamma$  qui l'inhibait (Schmitt *et al.* 1994; Dardalhon *et al.* 2008). Le TGF $\beta$  et l'IL-4 favoriseraient la production de cellules sécrétant de l'IL-9 (T CD4<sup>+</sup>, Treg et Th17) (Elyaman *et al.* 2009; Nowak *et al.* 2009; Beriou *et al.* 2010; Putheti *et al.* 2010).

*Récepteur* : L'IL-9R possède deux sous-unités : l'IL-9R $\alpha$  et l'IL-9R $\gamma$ c que partagent d'autres cytokines (IL-2, -4 et -7) (Russell *et al.* 1994; Renauld *et al.* 1992). L'IL-9R $\alpha$  est un membre de la superfamille des hématopoïétines. L'IL-9R est exprimé sur les lignées des LT, LT effecteurs, mais pas sur les LT naïfs (Cosmi *et al.* 2004; Druetz *et al.* 1990). Parmi les sous-ensembles de LT, l'IL-9R a une expression plus élevée dans les cellules T2 et T17 (Nowak *et al.* 2009). Chez les patients asthmatiques, l'IL-9R a été également identifiée au niveau des mastocytes et des PNN dans les poumons (Kearley *et al.* 2011; Abdelilah *et al.* 2001). Il a été évoqué que l'IL-9R soit exprimé au niveau des cellules non hématopoïétiques. En effet, l'IL-9 agit sur les cellules épithéliales des voies respiratoires et les CML mais la composition de l'IL-9R sur ces cellules n'est pas définie, car il est peu probable que l'IL-9R $\gamma$ c soit exprimée par des cellules non hématopoïétiques.

*Effets dans l'inflammation* : L'IL-9 est considérée comme un médiateur central dans la pathogénie de l'inflammation T2, dont l'asthme. L'expression de l'IL-9 et de l'IL-9R était plus élevée dans les voies respiratoires des sujets asthmatiques que dans celles des sujets témoins sains (Shimbara *et al.* 2000; Longphre *et al.* 1999). Ces résultats sont supportés par des travaux menés *in vitro* montrant que l'IL-9 joue un rôle dans l'activité de différents médiateurs pro-inflammatoires et profibrotiques impliqués dans la pathogénie de l'asthme (Oh *et al.* 2011). En effet, l'IL-9 induit la libération de chimiokines T2 (CCL11) au sein des CML des voies respiratoires humains *in vitro* (Gounni *et al.* 2004), ces dernières exprimant les deux sous-unités de l'IL-9R (Gounni *et al.* 2004). De plus l'IL-9 augmenterait l'expression de mucine au sein des cellules pulmonaires humaines, suggérant un rôle dans la CMC (Louahed *et al.* 2000). D'autres rôles rapportés à l'IL-9 ont été décrit (**Figure 27**) : augmentation de la susceptibilité à l'anaphylaxie systémique passive ou active (Knoops *et al.* 2005) ; diminution de la réaction systémique en cas de choc septique (Grohmann *et al.* 2000; Pilette *et al.* 2002) ; protection contre les parasites intestinaux ; régulation de l'immunité contre les infections virales (Dodd *et al.* 2009) ; et également une implication dans l'inflammation auto-immune (étude sur des modèles d'encéphalopathie auto-immune expérimentaux) (Jäger *et al.* 2009; C. Tan *et al.* 2010). Enfin, l'effet sur les cellules hématopoïétiques (LT, LB, mastocytes et progéniteurs) ne sera pas décrit car cela est hors du sujet de ce travail, en revanche l'effet sur les CEH est détaillé ci-dessous. L'expression transgénique de l'IL-9 dans les poumons est à l'origine d'une métaplasie des cellules épithéliales sécrétoires, comme cela a été décrit avec l'IL-13 ainsi que d'une hyperréactivité bronchique (U. A. Temann *et al.* 1998). L'IL-9 aurait des effets directs et indirects sur les voies respiratoires. En effet, certains effets de l'IL-9 dans les poumons seraient dus aux effets indirects de l'IL-13 (Steenwinckel *et al.* 2009; U.-A. Temann *et al.* 2007; U.-A. Temann, Ray, et Flavell 2002; Whittaker *et al.* 2002). Cette hypothèse suggère que l'IL-9 favorise l'inflammation par ses effets sur les cellules hématopoïétiques qui produisent ensuite de l'IL-13 pour avoir des effets directs sur l'épithélium des voies respiratoires (Steenwinckel *et al.* 2007). Enfin, il a été mis en évidence que l'ambrosie augmente la production d'IL-9 chez les patients allergiques (White *et al.* 2009) ce qui renforce son implication dans l'inflammation T2.

*Effets sur l'épithélium* : L'IL-9 a aussi un effet direct sur les CEH primaires des voies respiratoires, notamment l'induction des gènes du mucus (Longphre *et al.* 1999; Louahed *et al.* 2000; Reader *et al.* 2003; Vermeer *et al.* 2003). Les effets de l'IL-25 décrits précédemment sur l'inflammation allergique fonctionneraient via un mécanisme dépendant de l'IL-9 (Angkasekwinai *et al.* 2010). Dans une autre étude sur modèle murin, l'IL-9 entraînait des modifications des cellules épithéliales nasales murines avec une hyperplasie des cellules épithéliales et métaplasie des cellules sécrétoires (McLane, Haczku *et al.* 1998) comme cela avait été déjà décrit au niveau des poumons (U. A. Temann *et al.* 1998). L'IL-9 aurait également un effet sur le remodelage tissulaire, car l'utilisation d'un Ac anti-IL-9 *in vivo* sur des modèles murins a mis en évidence un effet protecteur contre le remodelage des voies respiratoires (Kearley *et al.* 2011). L'implication de l'IL-9 dans la PNS est moins décrite mais il est intéressant de noter que l'action conjointe de l'IL-5 et de l'IL-9 viendrait contrebalancer la diminution relative d'expression de l'IL-5R $\alpha$  au sein des polypes chez les patients atteints de PNS (Mortuaire *et al.* 2015). L'IL-9 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 *et al.* 2015). 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 EO (Louahed *et al.* 2001).

*Anticorps monoclonal* : En raison de son implication dans l'inflammation T2, des Ac anti-IL-9 sont en cours de développement, il s'agit du MEDI-528 (voir **Tableau 6** du chapitre 2.2.) (White *et al.* 2009; Gong *et al.* 2017; Oh *et al.* 2011; 2013).



**Figure 27. Représentation schématique des fonctions de l'IL-9**

Résumé des effets de l'IL-9 sur les cellules musculaires lisses, les cellules hématopoïétiques, les lymphocytes, les mastocytes et les cellules épithéliales.

Source : (Goswami et Kaplan 2011)

## d. Tableau de synthèse

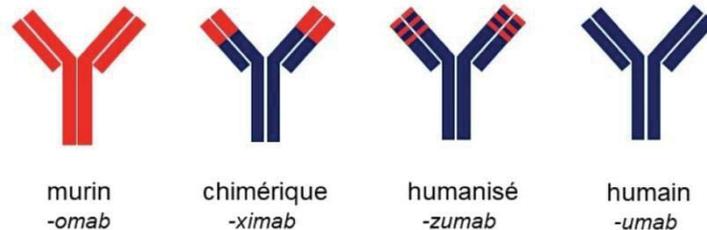
Cytokines	Famille	Source principale	Récepteurs	Effets sur l'épithélium
TSLP	IL-7	Cellules épithéliales	TSLPR et IL7R $\alpha$	↗ RETE ↗ protéines de JS
IL-25	IL-17	LT2, LT17 Cellules épithéliales	IL-17Rh1 et EVI27	↗ Eotaxin ↗ migration des EO, ↗ réparation épithéliale
IL-33	IL-1	CML Cellules épithéliales	IL-1RL et IL-1RacP	↘ infiltration par les EO ↘ IgE totales
IL-6	IL-6	LT, LB, monocytes macrophages, fibroblastes cellules endothéliales	IL-6R et gp130	↗ réparation épithéliale ↗ FBC ↗ LOOM ↗ prolifération des CENH
OSM	IL-6	LT2, EO, PNN macrophages	LIFR et gp130	↘ RETE ↗ expression IL-4R $\alpha$ ↗ expression de TSLP par les CENH
IFN $\gamma$	IFN	LT1	IFN $\gamma$ R1 et IFN $\gamma$ R2	↘ RETE ↘ réparation épithéliale ↘ proportion de cellules ciliées ↘ FBC (effets paradoxaux)
IL-4	/	LT2, EO, CIL2 basophiles mastocytes LNK	IL-4RI (IL-4R $\alpha$ et IL-4R $\gamma$ c) IL-4RII (IL-4R $\alpha$ et IL-13R $\alpha$ 1)	↘ RETE ↘ expression des protéines de JS ↗ proportion de cellules sécrétoires ↘ expression du gène MUC5AC ↘ sécrétion de mucine
IL-13	/	LT2, EO, basophiles mastocytes, monocytes LNK, LB	IL-13R (IL-4R $\alpha$ et IL-13R $\alpha$ 1)	↘ expression des protéines de JS ↘ adhésion inter-cellulaire ↗ proportion de cellules sécrétoires ↘ sécrétion de mucine ↘ expression du gène MUC5AC ↗ expression du gène MUC5B ↘ ou pas la FBC ↘ CMC
IL-5	/	LT2, EO, CIL2, mastocytes	IL-5R $\alpha$ IL-5R $\beta$ c	↗ relative de la vitesse de fermeture ↗ FBC
IL-9		LT2, mastocytes	IL-9R $\alpha$ IL-9R $\gamma$ c	↗ expression de l'IL-5R en présence d'IL-5 ↗ proportion de cellules sécrétoires ↗ expression des gènes à mucus

**Tableau 5. Synthèse des différentes cytokines impliquées dans la PNS**

Les effets directs des cytokines sur l'épithélium sont synthétisés dans ce tableau. Pour la source, les principales cellules impliquées sont mentionnées ; pour les récepteurs, les deux sous unités sont mentionnées. Abréviations : EO, Eosinophiles ; FBC, Fréquence du battement ciliaire ; LOOM, Longueur d'onde de l'onde Métachrone ; LT2, Lymphocytes Th2 ; LT1, Lymphocytes Th1 ; LNK, Lymphocytes natural killer ; RETE, Résistance électrique transépithéliale.

## 2.2. Biothérapies de l'inflammation T2

Les biothérapies, étymologiquement, correspondent à des traitements issus du vivant (hormones, extraits de plantes, d'animaux, enzymes, facteurs de croissance ou autres...). Aujourd'hui, le terme de biothérapies désigne des traitements issus des biotechnologies, donc produits par des bactéries ou des cellules animales génétiquement modifiées pour produire ces substances (Vidal®). Il peut s'agir d'AcM humains (-umab), humanisés (-zumab), chimériques (-ximab) ou murins (-omab) (**Figure 28**) qui servent à moduler la réponse inflammatoire, lutter contre le cancer ou contre des maladies chroniques.

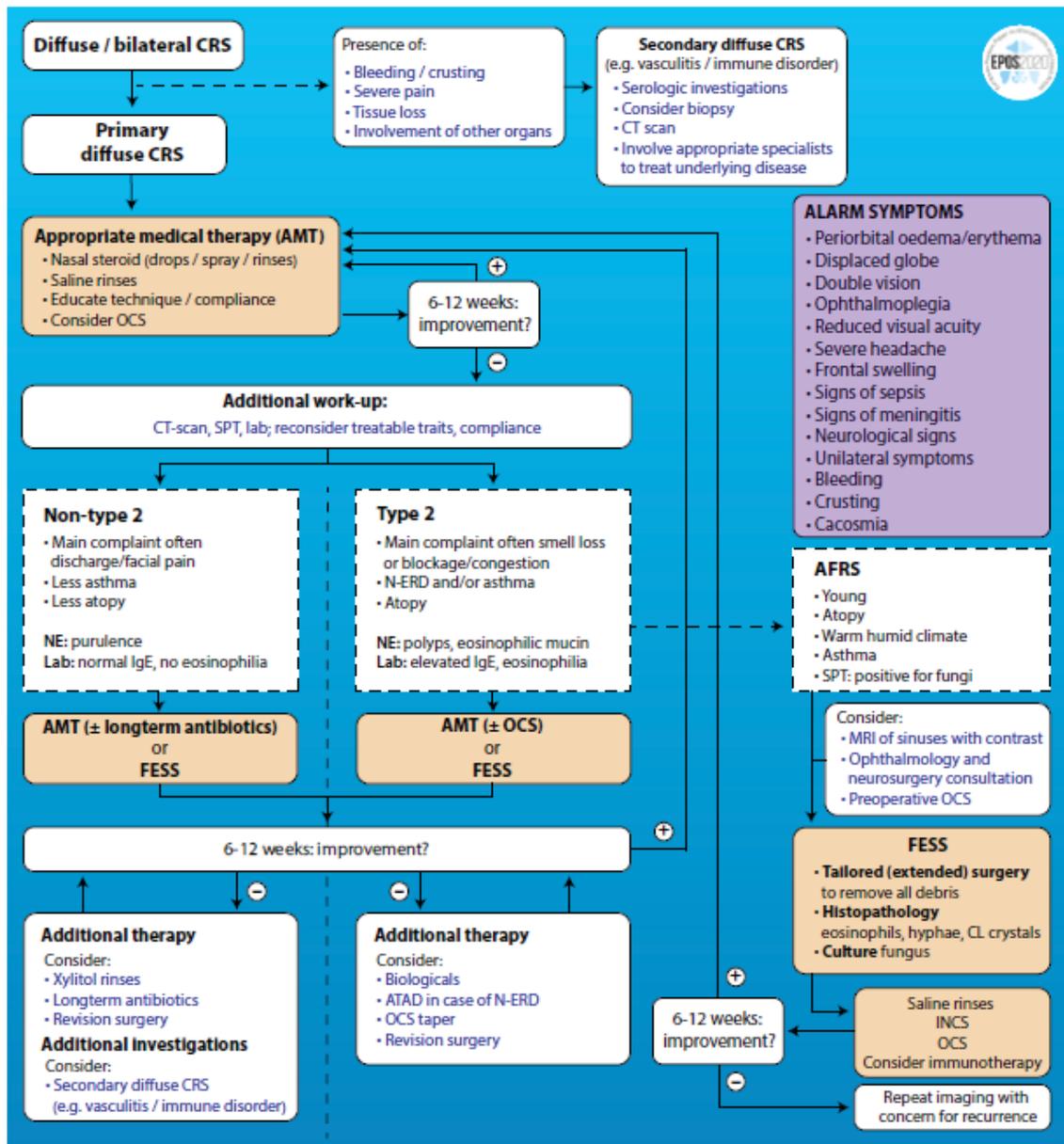


**Figure 28. Synthèse des différents types d'anticorps thérapeutiques**

Source : [https://acthera.univ-lille.fr/co/04\\_type.html](https://acthera.univ-lille.fr/co/04_type.html)

Dans la PNS, les biothérapies ciblent directement les facteurs clés de la voie inflammatoire T2 impliqués dans sa pathogénie. Il y a 2 types de médiateurs ciblés par ces biothérapies, les IL-4, -13 et -5, et les immunoglobulines E (IgE). Ces dernières sont déjà proposées comme traitement de 2<sup>ème</sup> ligne dans l'asthme sévère hyperéosinophilique depuis 2006, avec l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de l'omalizumab (anti-IgE). Alors qu'en 2007, l'algorithme de prise en charge de la PNS pouvait se résumer aux CSI, aux CSO et à la chirurgie, aujourd'hui deux biothérapies ont l'AMM en France dans la PNS sévère seule et non contrôlée par les CSO et la chirurgie (mépilizumab et dupilumab).

À l'heure actuelle, les biothérapies qui ont montré une efficacité sur les symptômes de la PNS sont au nombre de 5 : reslizumab (IgG4 kappa, anti-IL-5), benralizumab (IgG1 kappa, anti-IL-5R $\alpha$ ), mépolizumab (IgG1 kappa, anti-IL-5), omalizumab (IgG1 kappa, anti-IgE) et dupilumab (IgG4, anti-IL-4R $\alpha$ / $\gamma$ c et anti-IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ ) (W. J. Fokkens *et al.* 2020). Ces biothérapies sont administrées par voie sous-cutanée, au rythme d'une injection toutes les 2S ou tous les mois selon la molécule. La durée des traitements est variable selon les études qui vont de 24 à 52S, mais cela reste des traitements suspensifs et l'arrêt du traitement est synonyme de récurrence de la symptomatologie. La posologie est standardisée ou adaptée au poids du patient, mais parfois aussi à l'éosinophilie sanguine. L'algorithme de prise en charge a donc été mis à jour (**Figure 29**).



**Figure 29. Algorithme de prise en charge de la PNS selon l'EPOS**

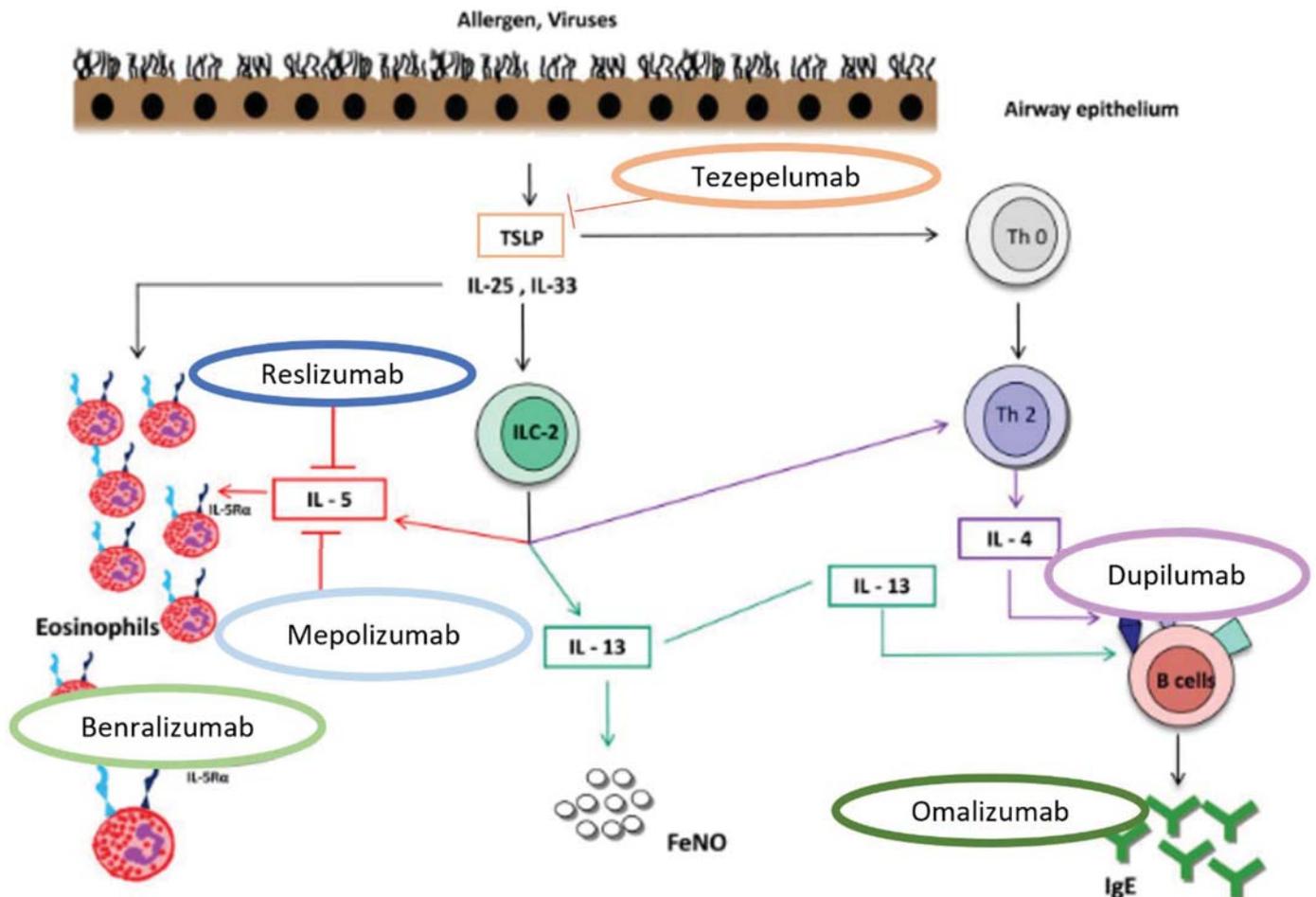
Abréviations : AMT, traitement médical approprié ; ATAD, traitement par aspirine après désensibilisation ; CT, Tomodensitométrie ; FESS, Chirurgie endoscopique sinusienne fonctionnelle ; INCS, corticothérapie intranasale ; MRI, Imagerie par Résonance Magnétique ; NE, Endoscopie Nasale ; OCS, Corticothérapie Orale ; SPT, Tests cutanés allergiques.

Source : (W. J. Fokkens et al. 2020)

En revanche de nombreuses autres biothérapies sont à l'étude, soit au niveau pré-clinique soit dans d'autres maladies T2 comme l'asthme ou la DA et n'ont pas encore été testées en essai de phase III dans la PNS ; un tableau détaillé des principales molécules, de leurs modes d'action et de leurs indications est présenté en fin de chapitre (**Tableau 6**).

### 2.2.1. Mécanisme d'action des biothérapies

Les mécanismes d'action des biothérapies varient en fonction de chaque molécule (**Figure 30**). Les AcM dirigés contre l'IL-5 circulante (reslizumab et mépolizumab) empêchent le recrutement et l'activation des EO. Les Ac dirigés contre les récepteurs des IL (ILR) : l'IL-5R (benralizumab) présent à la surface des cellules immunitaires effectrices telles que les LNK, entraîne l'apoptose des EO ; l'IL-4R $\alpha$  présent à la surface des cellules hématopoïétiques et des CENH bloque la voie de signalisation T2 et diminue la production d'IgE. Les Ac dirigés contre les IgE circulantes (omalizumab) empêchent la fixation des IgE sur le récepteur de forte affinité Fc $\epsilon$ RI présent sur les mastocytes, les basophiles et les EO, bloquant leur activation et leur multiplication. Chacune des biothérapies d'intérêt dans l'inflammation T2 sera détaillée selon le même plan, caractéristiques structurales, données pharmacodynamiques (PD) et pharmacocinétiques (PKs). Premièrement les biothérapies ayant l'AMM en France dans la PNS seront détaillées (dupilumab et mépolizumab), puis elles seront décrites par ordre d'AMM en France dans l'asthme. L'efficacité thérapeutique, la tolérance et les indications seront décrites ensuite pour l'ensemble des biothérapies selon la même chronologie avant un tableau de synthèse.



**Figure 30. Représentation schématique des cytokines impliquées dans la PNS et de leurs anticorps spécifiques**

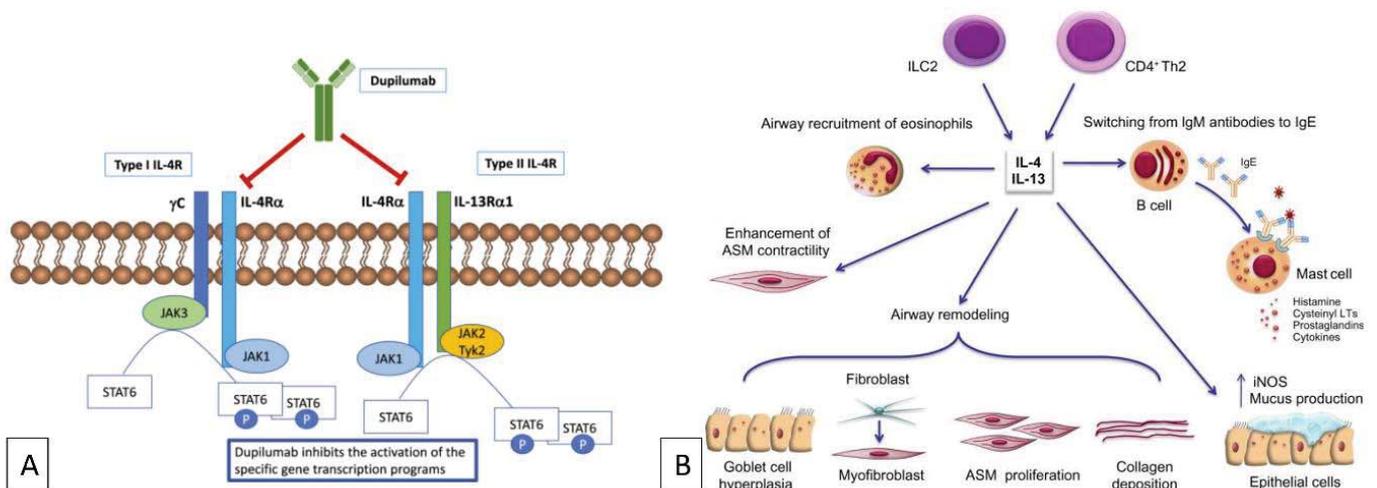
Source : (Menzella et al. 2020)

### a. Dupilumab

Le dupilumab (Dupixent®, Sanofi Aventis, Gentilly, France) est un AcM recombinant humain de 147 kDa (IgG4) qui inhibe la signalisation de l'IL-4 et de l'IL-13. Il s'agit d'un hétérotétramère covalent constitué de deux chaînes lourdes liées par des ponts disulfures, chacune étant liée par un pont disulfure à une chaîne légère  $\kappa$  humaine. Les domaines variables des chaînes lourdes et légères s'associent pour former le site de liaison de l'IL-4R $\alpha$  au sein de l'Ac (*monographies produits du Dupixent®*).

D'un point de vue PD, le dupilumab cible l'IL-4R $\alpha$  bloquant ainsi l'IL-4 et l'IL-13 (**Figure 31**). L'effet anti-IL-4 prévient l'activation des LB, la production d'IgE, l'amorçage des cellules innées exprimant le Fc $\epsilon$ RI et l'infiltration pulmonaire des LT pathogènes, tandis que l'inhibition de l'IL-13 prévient la métaplasie mucipare des CENH (Le Floc'h *et al.* 2020). D'autre part, le double blocage de l'IL-4/IL-13 par le dupilumab est nécessaire pour bloquer efficacement l'activation des CPA induite par les cellules T2, ainsi que l'éosinophilie pulmonaire et l'expression de cytokines et de chimiokines inflammatoires dans les poumons *in vivo* (Le Floc'h *et al.* 2020).

D'un point de vue PK, le  $T_{max}$  est de 3 à 7J. Les biodisponibilités absolues du dupilumab après injection SC sont entre 61% et 64%. L'état d'équilibre des concentrations est en général obtenu au bout de 16S. Les concentrations minimales à l'équilibre étaient de 39 et de 73 mg/L, respectivement, pour les doses de 200 et de 300 mg/2S. Étant donné la clairance non linéaire du dupilumab, l'exposition à ce médicament, mesurée par l'aire sous la courbe (AUC) des concentrations, augmente avec la dose de façon plus rapide que selon un mode proportionnel à la suite de l'administration de doses SC uniques de 75 à 600 mg. Le volume de distribution du dupilumab a été estimé à 4,6 L (distribution principalement dans le compartiment intravasculaire). Le dupilumab a l'AMM en Europe et en France dans le traitement de la PNS et partage les mêmes critères de prescription que le mépolizumab. Le dupilumab est également disponible à la prescription dans la DA, l'asthme et l'OeE.



**Figure 31. Représentation schématique des effets du dupilumab**

(A) Schéma de l'IL-4R type I et type II (B) Effets de l'IL-4 et de l'IL-13.

Abréviations : ILC2, Cellules de l'immunité innée de type 2 ; iNOS, oxyde nitrique de synthèse

Source : (A) <https://fr.acrobiosystems.com/A1746-IL-4R-Alpha-a-Potential-Drug-Target> (B) (Vatrella *et al.* 2014)

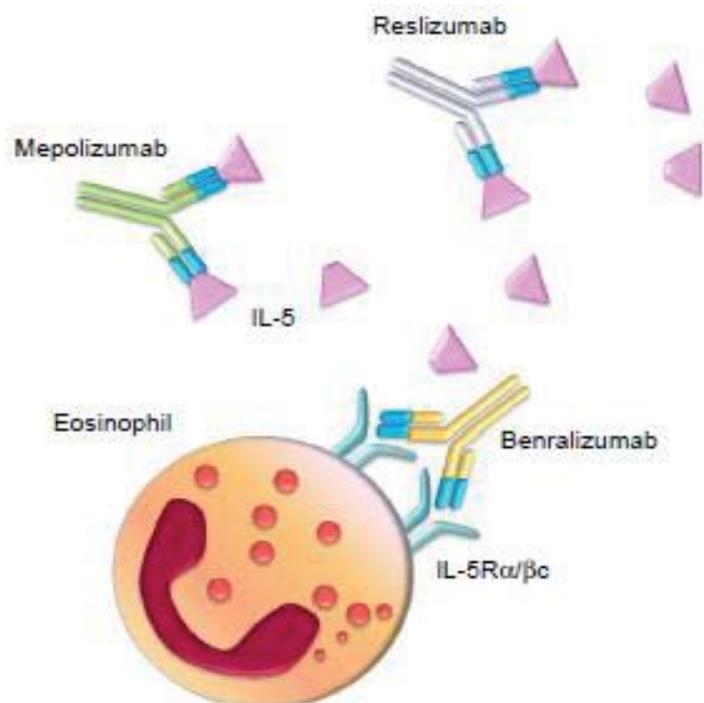
### b. Mépolizumab

Le mépolizumab (Nucala®, GlaxoSmithKline, Rueil-Malmaison, France ) est un AcM de 149 kDa (IgG1,  $\kappa$ ) qui cible l'IL-5 humaine avec une affinité et une spécificité élevées (**Figure 32**). Il est produit à l'aide de la technologie de l'ADN recombinant dans des cellules ovariennes de hamster chinois. Il s'agit d'une IgG1 constituée de deux chaînes lourdes de 449 aa et de deux chaînes légères de 220 aa. Les chaînes lourdes et légères sont liées de façon covalente par un unique pont disulfure.

D'un point de vue PD, le mépolizumab inhibe l'activité biologique de l'IL-5 à une concentration nanomolaire en bloquant la liaison de l'IL-5 à l'IL-5R $\alpha$  exprimé sur la surface cellulaire des EO. Il inhibe ainsi la voie de signalisation de l'IL-5 et réduit la production et la durée de vie des EO.

D'un point de vue PK, le mépolizumab administré par voie SC à des patients présentant un asthme et une PNS apparaît linéaire pour des doses comprises entre 12,5 mg et 250 mg. L'administration de 300 mg de mépolizumab par voie SC a permis d'obtenir une exposition systémique d'environ trois fois celle obtenue avec 100 mg de mépolizumab. Le T<sub>max</sub> est compris entre 4 et 8J. La biodisponibilité absolue du mépolizumab était respectivement de 64%, 71% et 75% après une injection unique en SC chez un sujet sain au niveau de l'abdomen, de la cuisse ou du bras. L'administration SC de doses répétées toutes les 4S entraîne une accumulation de l'exposition environ deux fois plus élevée à l'état d'équilibre. Le volume de distribution est compris entre 55 et 85ml/kg. La demi-vie terminale moyenne (t<sub>1/2</sub>) était d'environ 20J après une injection unique par voie IV (*monographies produits du Nucala®*).

Le mépolizumab a l'AMM en Europe et en France dans le traitement de la PNS et partage les mêmes critères de prescription que le dupilumab. Le mépolizumab est également disponible à la prescription dans la granulomatose éosinophilique avec polyangéite (GEPa) et le syndrome hyperéosinophilique (SHE).



**Figure 32. Schéma des cibles du mépolizumab, du benralizumab et du reslizumab**

Le reslizumab est un AcM qui inhibe les fonctions des éosinophiles comme le mépolizumab en bloquant l'IL-5, alors que le benralizumab bloque l'IL-5R $\alpha$ .

Source : (G. Pelaia et al. 2016)

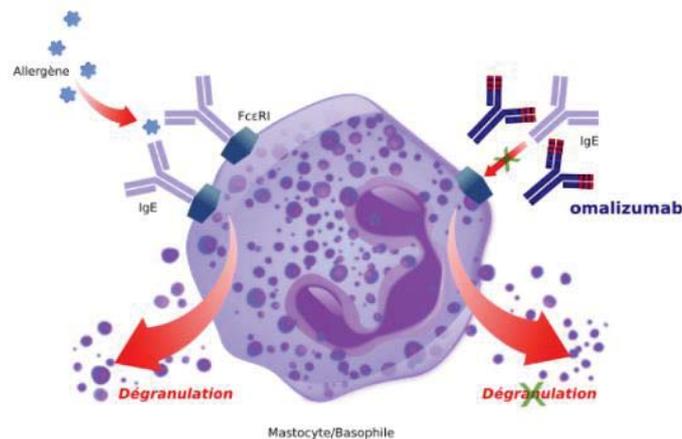
### c. Omalizumab

L'omalizumab (Xolair®, Novartis, Rueil-sur-Seine, France) est un AcM humanisé produit par la technique dite de l'ADN recombinant qui se fixe de manière sélective au domaine Cε3 des IgE humaines. La molécule appelée rhuMAb-E25 fait 149kDa et elle est constituée de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères. L'Ac est une IgG1 kappa obtenue par la fusion d'une région d'origine humaine avec des régions déterminant la complémentarité (CDR) provenant d'un Ac murin humanisé se fixant aux IgE. Le traitement par omalizumab inhibe l'inflammation médiée par les IgE, comme le montre la réduction des EO sanguins et tissulaires et celle des médiateurs de l'inflammation, notamment IL-4, IL-5 et IL-13 (*monographie produit du Xolair®*).

D'un point de vue PD, la formation du complexe omalizumab-IgE entraîne une augmentation significative des taux d'IgE totales (de 2 à 9 fois plus d'IgE totale en fonction de la dose) et une diminution du taux d'IgE sérique (Casale *et al.* 1997; J. V. Fahy *et al.* 1997; Boulet *et al.* 1997). L'omalizumab empêche la fixation des IgE aux FcεRI sur les basophiles et les mastocytes, 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 FcεRI (**Figure 33**) (*monographie produit du Xolair®*).

D'un point de vue pharmacocinétique, la concentration maximale moyenne d'omalizumab à l'état d'équilibre était de 30,9 mg/L après une dose initiale de 2,0 mg/kg et six doses ultérieures de 1,0 mg/kg administrées par voie IV pendant 77J à des patients adultes souffrant d'asthme allergique (Boulet *et al.* 1997). Après administration sous-cutanée, l'omalizumab est absorbé avec une biodisponibilité absolue moyenne de 62%. Sa demi-vie est de 1 à 4S. Le temps médian pour atteindre la concentration plasmatique maximale (T<sub>max</sub>) est de 14J suivant l'administration SC (valeur de référence donnée pour une dose de 0,15mg/kg administré par voie SC). Le profil PK d'omalizumab était similaire chez les adultes, les adolescents et les enfants (Easthope et Jarvis 2001).

L'omalizumab est indiqué en traitement additionnel, pour améliorer le contrôle de l'asthme chez les adultes et les adolescents (à partir de 12 ans) atteints d'asthme allergique persistant sévère, ayant un test cutané positif ou une réactivité *in vitro* à un pneumallergène perannuel, et qui, malgré un traitement quotidien par un corticoïde inhalé à forte dose et un β-agoniste inhalé à longue durée d'action (LDA), présentent une réduction de la fonction pulmonaire (VEMS<80% de la valeur théorique), des symptômes diurnes ou des réveils nocturnes fréquents, et des exacerbations sévères, multiples et documentées de l'asthme. Le traitement par Xolair® ne doit être envisagé que chez les patients présentant un asthme dont la dépendance aux IgE a été établie sur des critères objectifs. Il est aussi approuvé dans le syndrome de toux des voies aériennes supérieures. Ce produit n'est en revanche pas disponible à la prescription en France ou en Europe pour la PNS seule.



**Figure 33. Représentation schématique de l'effet de l'omalizumab sur les mastocytes et basophiles**  
 Source : ([https://acthera.univ-lille.fr/co/Omalizumab\\_\\_XOLAIRJ\\_\\_1.html](https://acthera.univ-lille.fr/co/Omalizumab__XOLAIRJ__1.html))

#### d. Reslizumab

Le reslizumab (Cinqaero®, Teva Santé, Paris, France) est une IgG4/κ dirigé contre l'IL-5. Il s'agit d'un AcM humanisé qui reconnaît l'IL-5 humain (K. F. Chung 2015; Walsh 2013; Egan *et al.* 1999). Le reslizumab a un poids moléculaire de 146 kDa.

D'un point de vue PD, le reslizumab se lie spécifiquement à l'IL-5 (affinité de l'ordre du picomolaire) et interfère avec la liaison de l'IL-5 à l'IL-5R (**Figure 32**) (Cardet et Israel 2015; H. F. Lim et Nair 2015; J. Zhang *et al.* 1999). L'IL-5 étant impliquée dans la différenciation, la maturation, le recrutement et l'activation des EO humains (voir chapitre 2.1.2.), le reslizumab réduit la survie et l'activité des EO.

D'un point de vue PK, le  $T_{max}$  (concentration de 80 µg/mL en moyenne) est habituellement observé à la fin de la perfusion. Après le pic plasmatique, les concentrations sériques du reslizumab diminuent généralement selon un schéma biphasique. La cinétique apparaît linéaire dans l'intervalle de doses compris entre 0,3 mg/kg et 3,0 mg/kg. La variabilité interindividuelle de la concentration maximale et de l'exposition systémique est d'environ 20% à 30%. Comme les autres AcM, le reslizumab est vraisemblablement dégradé en peptides de petites tailles et en a.a. par protéolyse enzymatique. Dans la mesure où le reslizumab se lie à un transporteur soluble, une clairance linéaire était attendue indépendamment de la fixation au transporteur (clairance = 7 ml/heure). Le reslizumab a une demi-vie d'environ 24J (*monographie produit du Cinqaero®*).

Le reslizumab était indiqué chez les adultes en traitement additionnel de l'asthme éosinophilique sévère insuffisamment contrôlé par les CSI à dose élevée associés à un autre médicament destiné au traitement de fond de l'asthme. Il a été mis à disposition le 16/08/2016 et retiré du marché le 14/03/2022 (<https://sante.lefigaro.fr/medicaments/3006738-cinqaero-10mg-ml-sol-inj-fl-10ml>). Il n'est donc pas disponible à la prescription, ni dans la PNS, ni dans l'asthme.

#### e. Benralizumab

Le benralizumab (Fasenra®, AstraZeneca, Courbevoie, France) est un AcM humanisé de 150 kDa (IgG1, kappa), afucosylé, anti-EO qui cible l'IL-5R. Il s'agit de la molécule MEDI-563 produite dans les cellules ovariennes de hamster chinois par des techniques d'ADN recombinant.

D'un point de vue PD, le benralizumab se lie sélectivement à l'IL-5Rα avec une affinité et une spécificité élevées (**Figure 32**). L'absence de fucose dans le fragment Fc du benralizumab se traduit par une affinité élevée pour les récepteurs FcγRIII présents à la surface des cellules immunitaires effectrices, telles que les LNK. Cela provoque l'apoptose des EO et des basophiles par cytotoxicité cellulaire dépendante des Acs, ce qui réduit l'inflammation éosinophilique.

D'un point de vue PK, après administration SC à des patients asthmatiques, la demi-vie d'absorption était de 3,5J. La biodisponibilité absolue a été estimée à environ 59%. Le volume de distribution centrale et périphérique du benralizumab est estimé à respectivement 3,1 L et 2,5 L chez un individu de 70 kg. Le  $T_{max}$  n'était pas disponible dans la fiche produit. La clairance systémique estimée du benralizumab a été de 0,29 L/J. Après l'administration SC, la demi-vie d'élimination était d'environ 15,5J (*monographie produit du Fasenra®*).

Le benralizumab est indiqué en traitement additionnel de l'asthme sévère à EO non contrôlé malgré des CSI à forte dose associée à des β-agonistes de LDA, uniquement chez les patients répondant aux critères suivants : un taux d'EO sanguins  $\geq 300$  cellules/µL à l'instauration du traitement ; et au moins deux épisodes d'exacerbations asthmatiques ayant nécessité un traitement par CSO ( $\geq 3$ J chacun) dans les 12 mois précédents malgré un traitement de fond associant des CSI à dose élevée et un bronchodilatateur de LDA (stade 4/5 GINA) ; ou un traitement par CSO pendant au moins 6 mois au cours des 12 mois précédents. Des ECR de phase 3 sont en cours dans l'objectif d'une AMM dans la PNS mais pour le moment il ne peut être prescrit dans cette indication en l'absence d'asthme associé.

## f. Tableau de synthèse

<b>Biothérapies</b>	<b>Cible</b>	<b>AMM (pays si hors France)</b>	<b>Année</b>
<b>Dupilumab</b>	IL-4R $\alpha$	PNS Asthme modéré à sévère éosinophilique Dermatite atopique Oesophagite à éosinophiles ECR en cours sur la PNS (phase 3-4)	2021 2018 2020 2022
<b>Mépolizumab</b>	IL-5	PNS Asthme sévère éosinophilique GEPa (USA) SHE (USA) ECR en cours sur la PNS (phase 3-4)	2022 2021 2021 2021
<b>Omalizumab</b>	IgE	PNS (UE) Asthme modéré à sévère éosinophilique ECR en cours sur la PNS (phase 3-4)	/ 2006
<b>Reslizumab</b>	IL-5	Asthme sévère éosinophilique ECR en cours sur la PNS (phase 3)	2017
<b>Benralizumab</b>	IL-5R $\alpha$	Asthme sévère éosinophilique ECR en cours sur la PNS (phase 2)	2018

<b>Biothérapies</b>	<b>Cible</b>	<b>ECR en cours (phase)</b>
CBP-201	IL4R- $\alpha$	ECR en cours sur la PNS
CM310	IL4R- $\alpha$	ECR en cours sur la PNS (phase 3)
<b>Tezepelumab</b>	TSLP	Asthme sévère éosinophilique ECR en cours sur la PNS (phase 3)
CM326	TSLP	ECR en cours sur la PNS (phase 1-2)
MEDI-528	IL-9	ECR en cours maladie T2 hors PNS
<b>Lebrikizumab</b>	IL-13	ECR en cours maladie T2 hors PNS
RPC4046	IL-13	ECR en cours maladie T2 hors PNS
<b>Depemokimab</b>	IL-15	ECR en cours sur la PNS (phase 3)
AMG 282	IL-33	ECR en cours sur la PNS (phase 1)
<b>Etokimab</b>	IL-33	ECR en cours sur la PNS (phase 2)
PF-06817024	PI3K/mTOR	ECR en cours sur la PNS (phase 1)
<b>Lirentelimab</b>	Siglec-8	ECR en cours maladie T2 hors PNS
TRL1068	DNABII protein	ECR en cours sur la PNS (phase 1)
GB001	PGDR2	ECR en cours sur la PNS (phase 2)

**Tableau 6. Synthèse des différentes biothérapies existantes ou en cours d'études dans la PNS**

*Abréviations : OeE, Oesophagite à éosinophile ; SHE, Syndrome d'Hyperéosinophilie ; GEPa, Granulomatose Eosinophilique avec Polyangéite ; ECR, Essai Clinique Randomisé ; USA, Etats-Unis ; UE, Union Européenne hors France.*

*Source : <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>*

### 2.2.2. Facteurs prédictifs de réponse au traitement

Une revue de la littérature a été rédigée sous la direction du Pr. Mortuaire concernant la prise en charge chirurgicale des patients atteints de PNS (*Fieux et al., Surgical management in CRSwNP : a review, submitted to European Journal of Medical Research depuis Mars 2023, Annexe 7*). Un des objectifs était d'identifier les facteurs associés à la rechute de la maladie après une première intervention chirurgicale. Les résultats de ce travail confirment l'efficacité à court terme (12 à 36 mois) de la chirurgie sur l'amélioration de la qualité de vie des patients mesurée par le score SNOT-22, bien que les données de la littérature soient insuffisantes pour conclure à la supériorité d'une procédure chirurgicale par rapport à une autre. Les auteurs ont mis en évidence qu'une approche non radicale comme première intervention était considérée comme un facteur de risque de récurrence de la maladie justifiant d'une reprise chirurgicale. Ainsi, alors que les facteurs prédictifs de récurrence chirurgicale dans la PNS sont bien identifiés, les facteurs prédictifs de réponse aux biothérapies sont moins connus (Wyske J. Fokkens *et al.* 2019; Claus Bachert *et al.* 2019a; 2017). Pour l'instant, l'association du phénotype (par exemple, PNS seul ou N-ERD), la réponse au traitement corticostéroïde systémique et éventuellement des marqueurs tels que les EO, la périostine et les IgE dans le sang ou les tissus sont les seuls éléments à disposition pour préciser l'endotype de PNS et prédire la réponse au traitement (W. J. Fokkens *et al.* 2020).

L'asthme, reconnu comme une comorbidité associée à des formes plus sévères de PNS, n'a pas été identifié comme prédictif de la réponse thérapeutique aux biothérapies, notamment l'omalizumab (Philippe Gevaert *et al.* 2020). En revanche, chez les patients asthmatiques, les données sont plus précises : i) la PNS et les comorbidités allergiques sont associées à une meilleure réponse à l'omalizumab ; ii) l'utilisation à long terme de stéroïdes systémiques est associée à une meilleure réponse aux biothérapies ciblant la voie de l'IL-5 ; iii) l'éosinophilie sanguine est un biomarqueur prédictif de la réponse aux biothérapies anti-IgE, anti-IL-5, anti-IL-5R $\alpha$  et anti-IL-4R $\alpha$  ; et iv) le dupilumab est particulièrement efficace chez les patients asthmatiques avec une inflammation T2 marquée (CSO au long cours, éosinophilie  $\geq 150/\mu\text{l}$  ou FENO  $> 20$  ppb) (Sesé *et al.* 2022).

Ensuite, l'éosinophilie sanguine, bien qu'elle ait été rapportée comme un biomarqueur prédictif de la réponse thérapeutique dans l'asthme (Ortega *et al.* 2016), les données publiées à ce jour ne permettent pas de valider cette hypothèse dans la PNS, que ce soit avec le dupilumab ou le mepolizumab (Claus Bachert *et al.* 2019a; Han *et al.* 2021). L'hypothèse initiale reposait sur des études publiées où l'éosinophilie sanguine était associée à des formes plus sévères de PNS (Matsuwaki *et al.* 2008; Sakuma *et al.* 2011; Ishitoya, Sakuma, et Tsukuda 2010; Y. Hu *et al.* 2012). Mais les analyses post-hoc réalisées à partir des données de SINUS-52 ne mettent pas en évidence de différence de l'efficacité du dupilumab selon le taux d'éosinophilie sanguine (Fujieda *et al.* 2022). Ainsi, aucune donnée n'existe à ce jour en ce qui concerne le taux d'EO dans les polypes, en tant que biomarqueur de réponse aux traitements.

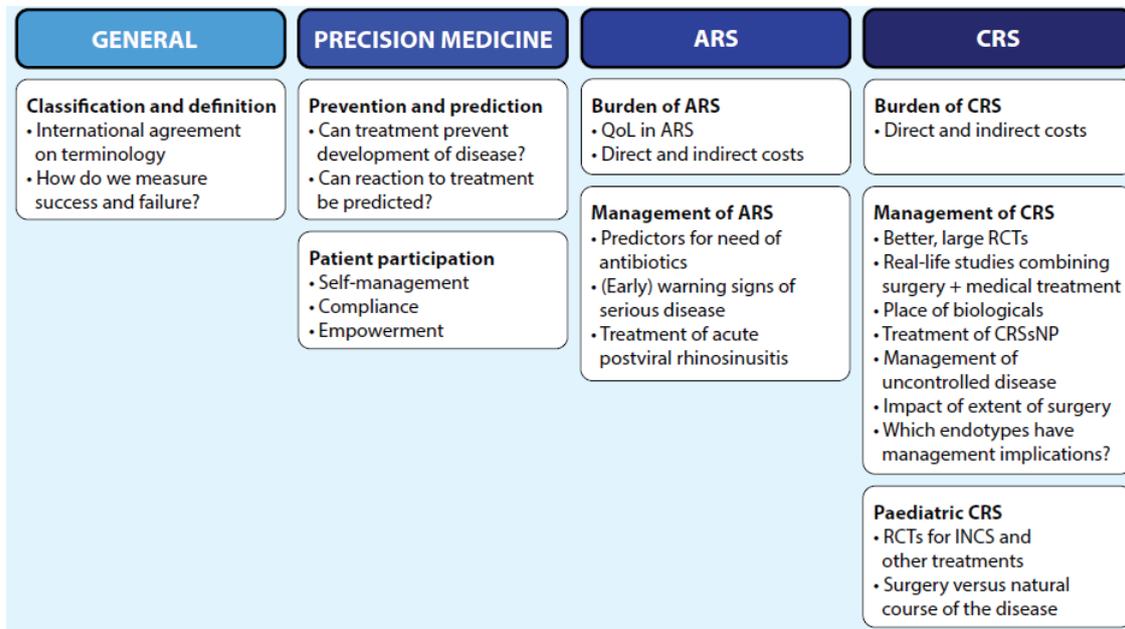
Une diminution du taux d'IgE totales a été mise en évidence chez les patients traités par dupilumab (Claus Bachert *et al.* 2019a), et la posologie de l'omalizumab dépend du taux d'IgE avant la mise en place de la biothérapie, mais cela est insuffisant pour en faire un biomarqueur de la réponse au traitement (Philippe Gevaert *et al.* 2020).

La périostine est une protéine matricellulaire et de la MEC capable d'activer les cellules en liant les intégrines aux récepteurs cellulaires, favorisant ainsi le remodelage des tissus. Elle pourrait être un biomarqueur T2 important (Kenji Izuhara *et al.* 2019). La périostine se situe en aval de l'IL-13 dans la cascade de l'inflammation T2. Les patients asthmatiques ayant un taux sérique élevé de périostine réagissent plus favorablement aux Acs anti-IL-13 (lebrikizumab) et aux Acs anti-IgE (omalizumab) (Kenji Izuhara, Ohta, et Ono 2016). De plus, la méthylprednisolone et l'omalizumab ont réduit de manière significative les taux de périostine sérique chez les patients atteints de PNS (De Schryver *et al.* 2017). La périostine sérique s'est avérée être le seul biomarqueur, parmi ceux qui ont été testés pour

détecter la présence de polypes nasaux et la corrélation avec le score de Lund-MacKay, significatif chez les patients atteints de RSC et d'asthme (Asano *et al.* 2017). La périostine sérique était significativement plus élevée chez les patients atteints de PNS par rapport aux autres (RSC ou sujets sains) (Maxfield *et al.* 2018; De Schryver *et al.* 2017; Kenji Izuhara, Ohta, et Ono 2016; Kenji Izuhara *et al.* 2019). En revanche, aucune donnée sur la réponse aux biothérapies et la périostine sérique n'existe dans la PNS.

Enfin, une étude de protéomique récente a été réalisée à partir de l'analyse de prélèvements sanguins réalisés précocement après l'initiation d'un traitement par dupilumab. Les auteurs ont mis en évidence que des niveaux élevés d'ostéoprotégérine (OPG) pourraient être considérés comme prédictifs de la réponse au traitement par dupilumab (Soyka *et al.* 2023) mais son dosage n'est pas disponible en pratique courante.

La première étude de grande envergure ayant essayé de définir les endotypes de PNS à partir de données tissulaires a utilisé une analyse en cluster à partir de biomarqueurs présélectionnés (cytokines T2, T2 et T3, neutrophiles, IgE du superAg staphylococciques, albumine, TGF- $\beta$ ) (Tomassen *et al.* 2016). Ainsi, dix endotypes ont pu être identifiés, quatre IL-5 négatifs (IL-5<sup>-</sup>) et six IL-5 positifs (IL-5<sup>+</sup>). Les patients dits IL-5 positifs, correspondaient aux patients pour lesquels la concentration en IL-5 tissulaire était supérieure à 12.98 pg/ml sur les prélèvements analysés (Tomassen *et al.* 2016). Parmi les six endotypes IL-5<sup>+</sup>, trois étaient considérés comme ayant un taux élevé d'IL-5 (257-483 pg/ml) et présentaient l'association la plus forte avec l'asthme et la présence de polypes (Claus Bachert *et al.* 2018; Thunberg *et al.* 2015; Tomassen *et al.* 2016). Il existait une corrélation entre l'intensité de l'inflammation T2, l'asthme et les polypes nasaux mais les données sur la réponse aux biothérapies n'étaient pas disponibles. Il n'existe donc à ce jour, aucun facteur prédictif de la réponse au traitement par biothérapie utilisable en routine dans la PNS et il s'agit d'un des futurs axes majeurs de recherche en rhinologie (**Figure 34**) comme mentionné dans l'EPOS de 2020 : « *Studies to determine the optimum biomarker before we initiate treatment (surgery, steroid or biologic)* » (W. J. Fokkens *et al.* 2020).



**Figure 34. Recherches scientifiques à mener en priorité dans la sinusite aiguë et chronique**

Abréviations : ARS, Rhinosinusite Aiguë ; QoL, qualité de vie.

Source : (W. J. Fokkens *et al.* 2020)

### 2.2.3. Profil de tolérance

Le profil de tolérance du dupilumab est basé sur les ECR de phase 3 SINUS -24 et -52 (Claus Bachert *et al.* 2019a; 2016; 2020; Marcant *et al.* 2021). Les EI non graves les plus fréquents sont les rhinopharyngites, les épistaxis, les réactions au point d'injection cutanée, et les céphalées. Quelques cas de décompensation asthmatique ont été également rapportés (environ 3% des cas dans le groupe dupilumab), ce qui peut avoir un impact sur la poursuite de la biothérapie (Claus Bachert *et al.* 2019a). Aucun EI grave n'a été rapporté. Dans les études sur l'usage du dupilumab dans les DA, 20% de cas d'hyperéosinophilie sanguine ( $> 1\ 500/\text{mm}^3$ ) ont été rapportés et sont donc surveillés par des bilans sanguins réguliers (NFS mensuelle) (Marcant *et al.* 2021).

Le profil de tolérance du mépolizumab est basé sur l'étude SYNAPSE et le nombre d'EI a été similaire entre les groupes mépolizumab et placebo (82% et 85%, respectivement). Le pourcentage d'EI graves était également similaire et très faible dans les 2 groupes, respectivement 6% et 7% dans le groupe mépolizumab et le groupe placebo. Les EI les plus fréquents ont été des céphalées, des rhinopharyngites et des dorsalgies. Il subsiste des incertitudes, au-delà d'1 an et demi de traitement, faute de données cliniques disponibles.

Le profil de tolérance de l'omalizumab a montré qu'il était très bien toléré (Belliveau 2005; Bidder *et al.* 2018; Philippe Gevaert *et al.* 2022). Les EI les plus fréquemment rapportés ayant été des réactions au site d'injection, de la fatigue et des céphalées. A long terme, une augmentation de la fréquence des cancers ne peut être exclue. Lors des essais cliniques, les cas de cancers observés ont été peu fréquents ( $<1/100$ ) mais un peu plus fréquents dans le groupe omalizumab [25 cancers sur 5015 patients (0,5%)] que dans le groupe placebo, [5 cancers sur 2854 patients (0,18%)]. La diversité des types de cancer observés, la durée d'exposition relativement courte et les caractéristiques cliniques de chaque cas rendent peu probable une relation de cause à effet. Le plan de gestion du risque validé par l'European Medicines Agency (EMA) fournira des données à long terme.

Le profil de tolérance du reslizumab est issu des études vs. Placebo (Castro *et al.* 2015; Corren *et al.* 2016; Bjermer *et al.* 2016). L'incidence des EI a été comparable entre les groupes placebo (81%) et reslizumab 3,0 mg/kg (67%). Pour l'ensemble des EI, l'incidence dans le groupe reslizumab était identique ou inférieure à celle observée dans le groupe placebo, à l'exception des tumeurs (bénignes ou malignes) pour lesquelles une incidence légèrement plus élevée a été rapportée dans le bras reslizumab (13 patients, 1%) vs. Placebo (4 patients,  $< 1\%$ ). L'EI le plus fréquemment rapporté a été l'asthme (23% dans le groupe reslizumab et 40% dans le groupe placebo). Les autres EI rapportés fréquemment ( $> 5\%$ ) ont été des rhinopharyngites, des infections respiratoires hautes, des céphalées et des sinusites.

Le profil de tolérance du benralizumab est basé sur l'étude SIROCCO, CALIMA et ZONDA (Bleecker *et al.* 2016; Nair *et al.* 2017; FitzGerald *et al.* 2016). Au cours de ces ECR réalisées chez des patients atteints d'asthme sévère de phénotype éosinophilique, les EI du médicament les plus souvent signalés durant le traitement ont été les céphalées, la pharyngite, et des réactions d'hypersensibilité.

### 3. Problématique

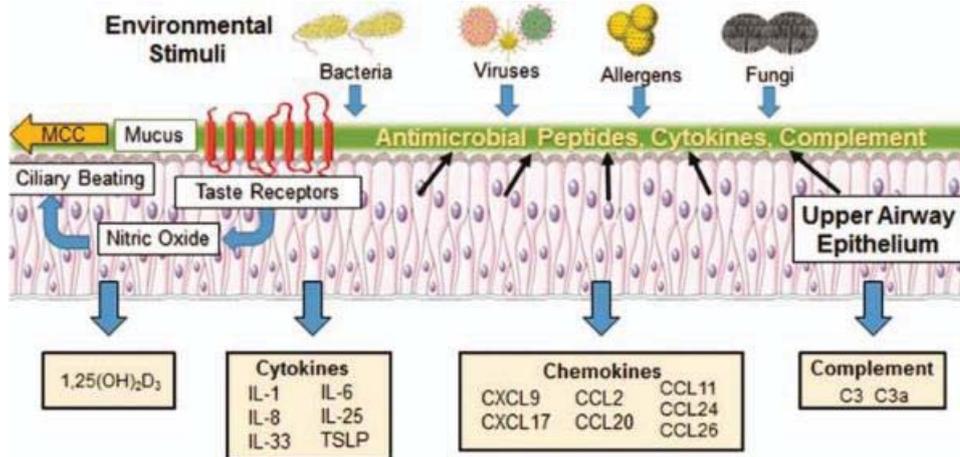
Alors que de nombreuses cytokines d'intérêt de l'inflammation T1 mais aussi de l'inflammation T2 ont déjà été largement étudiées, l'effet direct de certaines cytokines et l'action des biothérapies sur les CENH ne sont pas complètement élucidés et de nombreuses questions restent en suspens. Mes travaux font suite aux travaux du Pr. Coste et du Pr. Béquignon sur les CENH et récemment sur l'implication de l'IL-6 dans la pathogénie de la PNS (Bequignon *et al.* 2020).

- Est-ce qu'il y a un récepteur à l'IL-6 à la surface des CENH ?
- Est-ce que la CENH sécrète de l'IL-6 et quels sont les facteurs modulant cette sécrétion (agents agressants de l'environnement) ?
- Est-ce que l'IL-6 a un effet sur la fonction de barrière épithéliale (jonctions serrées), sur la prolifération cellulaire ou le cytosquelette ?
- Est-ce que d'autres cytokines de la famille de l'IL-6 pourraient jouer un rôle dans la pathogénie de la PNS, comme l'OSM, qui a fait la preuve de son effet sur les fibroblastes ?
- Quel est l'effet de l'IL4, de l'IL5, et de l'IL-13 sur l'épithélium nasal humain (barrière, CMC, réparation épithéliale) ?
- Quel est l'effet du dupilumab sur les CENH (barrière cellulaire, CMC, réparation) ?
- Quel est l'effet du dupilumab en présence de ses cibles thérapeutiques, l'IL-4 et l'IL-13 ?
- Est-ce que le dupilumab agit directement sur la cellule épithéliale ou, est-ce qu'il traverse l'épithélium pour ensuite avoir un effet thérapeutique sur la régulation de l'inflammation T2 dans la circulation sanguine ?
- L'effet du mépolizumab est-il similaire ? Que se passe-t-il en présence d'IL-5 ?

Nous avons décidé d'orienter nos travaux sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la PNS et d'étudier les effets de l'OSM et de l'IL-6. Un article a été publié dans l'*IJMS* (IF =6, rang B) dont les résultats sont présentés dans le chapitre 6. Ensuite, nous avons réévalué l'effet de l'IL-4 et de l'IL-13 sur les CENH car les résultats ne sont pas consistants dans la littérature, puis nous avons étudié l'effet direct du dupilumab sur les CENH en présence et en l'absence de stimulation T2 pour explorer son mode d'action thérapeutique et obtenir des données de toxicité épithéliale. Un article a été soumis pour publication dans le *JACI* (IF=14, rang A) dont les résultats sont présentés dans le chapitre 7. Ces deux travaux ont été menés en collaboration avec le Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC, Poitiers, France) et le Dr. Florent Carsuzaa, étudiant en thèse d'Université.

## 4. Méthodes pour l'étude des fonctions épithéliales

L'épithélium nasal humain est la première ligne de défense contre les agents agressants extérieurs (**Figure 35**). Trois principales fonctions épithéliales peuvent être distinguées, toutes fondamentales, pour assurer cette protection. Premièrement, la fonction de barrière, mais aussi la CMC et enfin, la réparation cellulaire. Les outils utilisés dans le cadre de mes travaux de recherche sur l'épithélium, permettant l'évaluation de chacune de ses fonctions, sont détaillés ci-dessous.



**Figure 35. Protéines impliquées dans la fonction de barrière de l'épithélium respiratoire**

L'épithélium des voies aériennes supérieures est un acteur clé de l'immunité innée et adaptative. Il constitue la première ligne de défense contre les agents agressants inhalés. L'épithélium tue ou neutralise les micro-organismes inhalés en libérant des peptides antimicrobiens et coordonne leur élimination grâce à la clairance mucociliaire. Les cellules épithéliales cylindriques ciliées pseudostratifiées reliées par des jonctions serrées, des jonctions d'adhérence, des jonctions lacunaires et des desmosomes servent également de barrière physique qui empêche les irritants inhalés de passer dans l'espace sous-épithélial situé en dessous. L'exposition à des substances étrangères déclenche la libération par l'épithélium de cytokines inflammatoires qui influencent la fonction des LT, des cellules dendritiques et des EO. L'épithélium est également une source riche de nombreuses chimiokines qui modulent l'activité des LT, des cellules dendritiques et des EO. Les altérations de ces fonctions épithéliales sont étroitement liées à la pathogénie de la PNS. Source : (Wynne et al. 2019)

### 4.1. Le modèle de cultures primaires de CENH

Différentes méthodes de recueil de cellules épithéliales des voies respiratoires existent. Elles permettent d'obtenir soit des cellules bronchiques humaines (CEBH) soit des cellules épithéliales nasales humaines (CENH) (Jetten 1991; Coste et al. 2000). Initialement développés à partir d'explants de trachées humaines (Yamaya et al. 1992), les modèles de culture primaire de CENH sont aujourd'hui réalisés à partir de déchets opératoires de polypes prélevés chez des patients opérés d'ethmoïdectomie pour PNS. La culture primaire de CENH issues de polypes permet d'obtenir des modèles purement épithéliaux permettant d'appréhender *in vitro* les grandes fonctions épithéliales. Notamment, le mécanisme de réparation et de différenciation après réalisation d'une agression soit chimique (Buisson, Gilles, et al. 1996), soit mécanique est depuis longtemps étudié (Lechapt-Zalcman et al. 2006). Il a été mis en évidence que, pour fermer une blessure épithéliale, les cellules des berges acquéraient un phénotype migratoire permettant la couverture de la zone blessée (Zahm, Chevillard, et Puchelle 1991; Buisson, Zahm, et al. 1996). Ces modèles permettent également d'étudier l'effet des cytokines sur le processus de réparation. En particulier, le TGFβ1, ajouté au milieu de culture juste après agression, accélère la vitesse de migration des cellules (Lechapt-Zalcman et al. 2006). Enfin, le TGFβ1 inhibe l'expression du CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), canal ionique dont la mutation est impliquée dans la physiopathologie de la mucoviscidose, et modifie les transports ioniques dans les CENH (Prulière-Escabasse et al. 2005). D'autres modèles réalisent des cocultures de cellules

épithéliales et de fibroblastes ou de cellules épithéliales et de cellules inflammatoires dans le but d'étudier les interactions qui existent entre ces populations cellulaires et avec les IL de l'environnement (Carsuzaa *et al.* 2022).

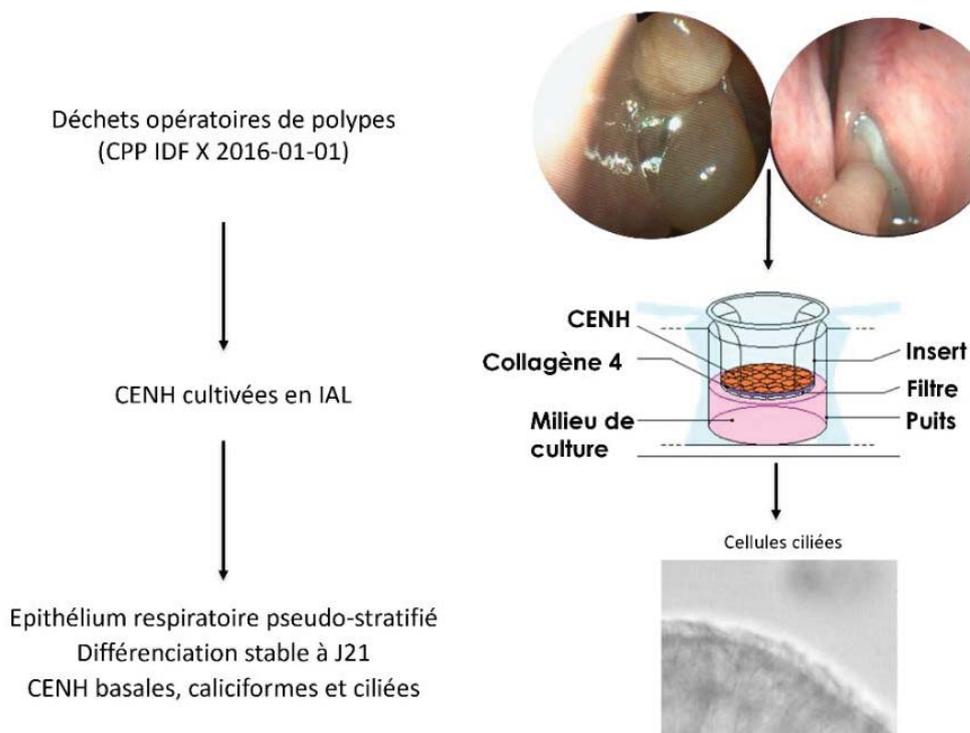
Pour ce travail de thèse, j'ai utilisé un modèle de cultures primaires de CENH en IAL mis au point et caractérisé au sein de l'équipe « Biomécanique de l'appareil respiratoire » par le Dr Escudier et le Pr Coste afin d'étudier le rôle des CENH dans la physiopathologie de la PNS (Coste, Wang, *et al.* 1996; Coste, Rateau, Bernaudin, *et al.* 1996). Il a été caractérisé sur le plan morphologique et fonctionnel (Coste *et al.* 2000; Papon *et al.* 2002). La nature épithéliale des CENH cultivées en IAL a été confirmée par cytométrie en flux et par analyse de l'immunofluorescence (IF) de la cytokératine 14. Après une prolifération intense au cours de la première semaine, les cellules épithéliales atteignent leur stade différencié pendant la troisième semaine de culture avec présence de cellules basales, ciliées et sécrétoires produisant du mucus à la surface des cultures (Coste *et al.* 2000; Papon *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 puits) et placées en IAL au bout de 48 h. Cette méthode de culture permet d'obtenir, après une phase de prolifération précoce de quelques jours, des cellules bien différenciées avec, dès J21 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 cils. Des mesures de la RETE sont réalisées au moyen d'un microvoltmètre épithélial (EVOM) avant toute expérimentation pour s'assurer de la qualité de la culture et du bon développement de JS étanches. En effet, la culture primaire de CENH est fragile et hétérogène, ainsi, les cultures ayant une RETE  $< 200 \text{ Ohm.cm}^2$  ne seront pas utilisées à des fins d'analyse du comportement cellulaire (Gruenert, Finkbeiner, et Widdicombe 1995). Il faut environ 21J pour obtenir des CENH dont la barrière épithéliale est étanche et la CMC est efficace. Ce modèle qui reproduit des conditions très proches de celles *in vivo* apparaît ainsi comme un meilleur modèle que les lignées cellulaires pour étudier les mécanismes métaboliques et moléculaires de l'épithélium des voies respiratoires en situation physiologique ou pathologique (exposition à des protéines de l'inflammation ou des aérocontaminants). Ce modèle a servi de support à de nombreuses publications concernant : i) l'interaction entre l'épithélium et l'*Aspergillus Fumigatus* (Françoise Botterel *et al.* 2008; F. Botterel *et al.* 2002; Khoufache *et al.* 2007) ; ii) l'effet des microparticules de gaz d'échappement sur l'épithélium (Boland *et al.* 1999) ; iii) la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par l'épithélium (Coste *et al.* 2000) ; iv) l'effet des cytokines sur l'épithélium (Laoukili *et al.* 2001; Papon *et al.* 2002) ; v) la physiopathologie de la mucoviscidose (Prulière-Escabasse *et al.* 2005; 2007; 2010; Ludovic Jeanson *et al.* 2014) ; vi) la physiopathologie de la PNS (Diane S. Lazard *et al.* 2007; D. S. Lazard *et al.* 2009; L. Jeanson *et al.* 2012; Bequignon *et al.* 2020) ; vii) les différents outils d'analyse de la CMC (Bottier, Blanchon, *et al.* 2017; Bottier, Peña Fernández, *et al.* 2017) ; viii) l'administration non invasive par voie nasale de biothérapies (Bequignon *et al.* 2019) ; et ix) l'efficacité des traitements anti-SARS-Cov-2 (Morin-Dewaele *et al.* 2022; Majidipur *et al.* 2023).

Pour cette thèse, les déchets opératoires étaient récupérés au cours d'ethmoïdectomies réalisées dans le Service d'ORL et de chirurgie cervico-faciale du Pr Coste à l'Hôpital Intercommunal de Créteil. Uniquement les polypes de patients atteints de PNS étaient utilisés. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé et l'étude a été approuvée par le comité d'éthique local (CPP IDF X 2016-01-01). Tous les patients se sont abstenus de prendre de la CSO pendant un mois avant l'intervention chirurgicale. Les tissus ont été immédiatement placés dans un milieu de culture et transportés au laboratoire pour l'isolement et la culture des CENH comme détaillé dans le protocole mis en annexe (**Annexe 8**).

Pour illustrer rapidement le protocole (**Figure 36**), les polypes nasaux sont immédiatement placés dans du DMEM/F-12 additionné d'antibiotiques et envoyés au laboratoire pour y être traités. La digestion enzymatique est réalisée pendant 16 h à 4°C. Les CENH (1.10<sup>6</sup> cellules par puits) ont ensuite été placées dans des inserts (Transwell 12 mm ; Costar, MA, USA) avec des membranes micropore en polycarbonate de 12 mm de diamètre (taille des pores de 0,4 µm) enduites de collagène de type IV (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et incubées à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub>. Pendant les premières 24h, les cellules ont été incubées avec de l'Ultrosor G. Après 24-48 heures (24-48h), le milieu de culture (Stemcell, Saint Egrève France, milieu Pneumacult-ALI) dans l'insert a été retiré pour placer les cellules en IAL. Le milieu de la chambre inférieure a ensuite été changé tous les jours. La nature épithéliale des cellules cultivées avait déjà été confirmée par l'analyse cytométrique du marquage immunofluorescent de la cytokératine qui montrait 95% et 99% de cellules positives à J3 et J7, respectivement (Papon *et al.* 2002). Les CENH ont atteint un état différencié stable avec la détection de cellules ciliées, sécrétoires et basales au cours de la troisième semaine de culture (J21) en utilisant le milieu de culture ALI (Stemcell, milieu Pneumacult-ALI).

Pour s'assurer de la fiabilité des analyses statistiques, un minimum de n=5 était nécessaire pour l'étude de la fonction de barrière (expression des JS par western blot (WB)), de la fonction de réparation (modèle de blessure avec suivi de la vitesse de réparation épithéliale) et de la fonction de CMC (analyse de l'indice d'efficacité de la CMC). Pour l'immunofluorescence, un minimum de n=3 était nécessaire pour s'assurer de la reproductibilité des résultats iconographiques. Au total, 62 patients ont été nécessaires pour l'ensemble de ce travail sur les fonctions épithéliales. En moyenne un patient permet d'obtenir une culture de 12 puits mais cela variait entre 5 et 35 puits (soit entre 5.10<sup>6</sup> à 35.10<sup>6</sup> CENH extraites par patient), ainsi le nombre de puits moyen par patient était de 15,3 ±7,2 et les cultures utilisées en moyenne au 29<sup>ème</sup> jour ±4. Parmi eux, 27 patients correspondant à 243 puits ont été utilisés pour l'étude de l'ensemble des fonctions épithéliales pour l'OSM et de l'IL-6 ; et 35 patients correspondant à 388 puits ont été utilisés pour l'étude sur l'IL-4, l'IL-13 et le dupilumab.



**Figure 36. Modèle de culture primaire de CENH à l'interface air-liquide**

*A partir des déchets opératoires issus de patients opérés d'une ethmoïdectomie, une culture différenciée de cellules épithéliales nasales est obtenue après 21J de culture en IAL.*

## 4.2. La fonction de barrière épithéliale

L'évaluation de la fonction de barrière au sein de ce travail sera réalisée à l'aide de trois outils différents : l'analyse de l'expression protéique de protéines dominantes des JS (occludine et ZO-1) par western blot, l'analyse en IF de la ZO-1 au niveau du pôle apical des CENH et la mesure de la RETE.

### 4.2.1. Expression des protéines de jonctions serrées (JS)

Pour évaluer les niveaux d'expression des principales protéines de JS, l'occludine et la ZO-1, un western blot a été réalisé. Les cellules étaient préalablement stimulées par les cytokines pendant 48h. Les concentrations de 1 ng/ml, 10 ng/ml et 100 ng/ml ont été choisies à partir de travaux antérieurs ayant montré un effet des IL sur les cellules épithéliales (Wise *et al.* 2014; 2013; Bequignon *et al.* 2020; Seong H. Cho *et al.* 2015) afin d'identifier un effet dose-réponse. Les cellules étaient d'abord lysées avec 350  $\mu$ l de tampon de dosage par radio-immunoprécipitation (RIPA), et les concentrations de protéines étaient déterminées par dosage BiCinchoninic acid Assay des protéines totales (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Après séparation sur un gel SDS-PAGE 4-20% (NuSep, Germantown, France), les protéines étaient transférées sur des membranes de nitrocellulose (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). L'immunodétection de l'occludine, de ZO-1 et de la GAPDH était réalisée par co-incubation avec un Ac de lapin anti-occludine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), un Ac de souris anti ZO-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et un Ac anti-GAPDH de souris (Novus, clone 2D4A7), suivie d'une co-incubation avec des Acs polyclonaux anti-lapin et anti-souris (IgG) conjugués à la peroxydase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). L'activité de la peroxydase était détectée par chimiluminescence (substrat Luminata HRP de Merck Millipore Burlington, MA, USA) et analysée à l'aide d'un système d'imagerie LAS-3000. L'intensité du signal a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ v1.53k. Ensuite, les rapports occludine et ZO-1/GAPDH étaient calculés pour pouvoir comparer les différentes conditions.

### 4.2.2. La résistance électrique transépithéliale (RETE)

Le RETE fournit une mesure physique de la résistance électrique à travers la barrière épithéliale, largement utilisée comme indicateur de perméabilité *in vitro* (Klingberg *et al.* 2005). Dans le cadre de cette thèse, la RETE a été mesurée à l'aide d'un volt-ohmmètre épithélial (Epithelial Volt/Ohm Meter 3, EVOM3, **Figure 37**) équipé d'une électrode ENDOHM-12 (World Precision Instruments, New Haven, CT, USA). Les valeurs pour les filtres recouverts de cellules ont été exprimées en unité standard d'ohms par centimètre carré ( $\Omega/\text{cm}^2$ ) après soustraction de la résistance des filtres vierges et sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard (SD). Les mesures de RETE ont été utilisées avant chaque expérience pour évaluer la viabilité cellulaire (Yeo et Jang 2010) et, comme mentionné précédemment, seules les CENH avec une RETE  $> 200 \Omega/\text{cm}^2$  ont été utilisées. Le protocole permettant la réalisation des mesures de RETE est disponible en annexe (**Annexe 9**). Pour calculer la RETE, il faut multiplier la résistance mesurée par l'électrode par la surface en fonction de la taille du puits (basée sur le nombre de puits par plaque). Pour une plaque de 12 puits, les inserts font 12 mm, et il faut multiplier la résistance (mesurée en Ohm) par la surface ( $1,13\text{cm}^2$ ) pour obtenir la valeur exacte de la RETE en  $\Omega/\text{cm}^2$ . Par exemple, un insert de 12 mm mesure  $565 \Omega$ , la RETE est  $565 \Omega * 1,13$ , soit  $638 \Omega/\text{cm}^2$ .



**Figure 37. EVOM3 avec son électrode STX2-PLUS de chez World Precision Instruments**

*Appareil de mesure EVOM3 avec son électrode STX2-PLUS permettant de faire les mesures en  $\Omega/cm^2$ .*

*Source : Data sheet EVOM3 WPI*

L'EVOM3 est l'instrument le plus récent de chez World Precision Instruments (Sarasota, Floride, Etats-Unis). Il permet de réaliser des mesures précises et reproductibles et facilite le transfert de données. Les informations relatives à la résistance ou à la tension sont directement implémentées sur une clé USB dans un format (.csv) grâce à une pédale de commande. L'instrument contrôlé par le processeur est stable et précis. L'interface à écran tactile est facile à utiliser et à configurer pour le réglage des puits de contrôle. La fonction de mesure automatique de la résistance permet des mesures rapides, et il y a une fonction d'affichage en cas de dépassement de la plage pour éviter les fausses lectures. L'électrode STX2-PLUS est parfaitement adaptée au transwell en IAL de 12 puits et peut être placée dans l'insert sans léser l'épithélium grâce aux deux bras de l'électrode qui ne sont pas de la même longueur. La confluence d'une monocouche cellulaire est déterminée par une augmentation ou un plateau de la résistance tissulaire détectée par l'EVOM3. L'EVOM3 produit un faible courant alternatif qui évite les dépôts métalliques sur les électrodes et les effets néfastes sur les tissus qui peuvent être causés par des courants continus plus élevés. L'EVOM3 utilise des courants et des tensions faibles, il est conçu pour effectuer des contrôles non destructifs de la confluence des monocouches épithéliales *in vitro*. La précision et la répétabilité du système EVOM3-STX2-PLUS font de cet instrument un outil idéal pour les études de perméabilité épithéliale et c'est pourquoi il a été choisi pour ce travail de thèse.

Pour évaluer l'effet des cytokines sur la fonction de barrière épithéliale, la perméabilité épithéliale a été déterminée en mesurant le RETE des CENH stimulées ou non stimulées avant et après 48 h d'exposition à différentes concentrations d'IL (1 ng/ml ; 10 ng/ml et 100 ng/ml). Les cellules traitées avec uniquement du milieu de culture servaient de contrôle.

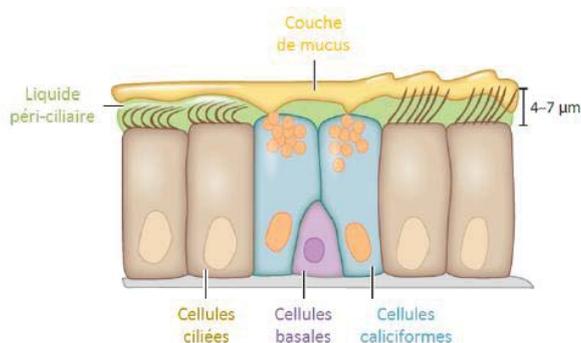
### 4.2.3. L'immunofluorescence

Le deuxième outil utilisé pour mesurer l'expression des protéines de JS était l'histochimie (HC) et l'immunohistochimie (IHC). Après 48 h d'exposition aux différentes conditions selon les plans de plaque définis pour chacun des articles de ce travail de thèse (IL-6 et OSM ; et IL-4, IL-13 et dupilumab), les CENH étaient fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) pour être conservées à +4°C. Le détail du protocole permettant de réaliser les analyses d'HC et d'IHC au microscope confocal est fourni en annexe (**Annexe 10**). Simplement, un Ac primaire et un Ac secondaire fluorescent étaient utilisés pour l'IHC des protéines de JS (ici, la ZO-1). Après 48 h d'incubation à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> dans du milieu de culture supplémenté en IL (IL-6, OSM, IL-4 ou IL-13 à 1, 10, ou 100 ng/ml de concentration finale), associé ou non à un Ac thérapeutique à 0,04 ng/ml ou dans du milieu de culture seul (condition contrôle), une fois les mesures de RETE effectuées, les cellules ont été lavées avec du *phosphate buffer saline* (PBS) puis fixées pendant 10 min dans du PFA à 4%. La première étape de l'immunomarquage a consisté à perméabiliser les cellules par l'ajout de 0,3% de Triton dans du PBS Ca<sup>+</sup> et Mg<sub>2</sub><sup>+</sup> (PBS<sup>+/+</sup>). Les sites non spécifiques ont été bloqués par incubation de PBS avec 1% d'albumine de sérum bovin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) et du sérum de chèvre (*Normal Goat Serum*, NGS) soit un mélange de PBS-BSA-NGS-1% pendant 30 minutes à température ambiante (*Room Temperature*, RT). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 h à RT avec le réactif rhodamine-phalloïdine (ab235138, Abcam, Cambridge, United Kingdom) dilué à 1/2000 dans du PBS-BSA-NGS 1%. Il ne s'agit pas ici d'un immunomarquage mais simplement d'HC marquant les fibres d'actines en vert. Ensuite, les cellules ont été incubées avec un Ac polyclonal Anti ZO-1 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) dilué à 1/1000 dans du PBS-BSA-NGS 1% pour évaluer l'expression de ZO-1. Le marquage ZO-1 a ensuite été révélé à l'aide d'un Ac secondaire marqué à l'Alexa-488 (Life Technology, Carlsbad, Californie, États-Unis d'Amérique, A-21042 dilué à 1/1000 dans PBS-BSA-NGS 1%). Après rinçage au PBS<sup>+/+</sup>, le fond de l'insert a été découpé et mis en place sur lame, la face cellulaire vers le haut. Une solution de montage contenant un marquage des noyaux, ProLong™ Gold Antifade Mountant with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; P36935, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a ensuite été déposée et l'ensemble recouvert d'une lamelle.

Les lames ont été stockées à +4°C puis les images ont été acquises dans les quinze jours suivants sur un microscope confocal Axio Imager (Zeiss, Oberkochen, Bade-Wurtemberg, France) à un grossissement de 63×. Le délai de quinze jours doit être respecté pour ne pas réduire l'IF des lames qui peut s'estomper. Nous avons choisi d'acquérir toutes les images au pôle apical de la cellule pour nous concentrer sur l'une des protéines constitutives de la ceinture de JS (la ZO-1), c'est pourquoi les fibres d'actine et les noyaux étaient plus difficiles à analyser. L'immunomarquage et le marquage ont été effectués trois fois, mais seule une unique image par condition est présentée. Comme nous avons utilisé les mêmes paramètres (intensité de marquage et grossissements) pour toutes les conditions, une analyse qualitative a été réalisée entre les conditions.

### 4.3. L'efficacité du battement ciliaire

Les CENH ciliées possèdent environ 200 cils chacune avec une densité d'environ 5 à 8 cils par  $\mu\text{m}^2$  (Hill *et al.* 2010). Le battement des cils mobiles respiratoires s'effectue principalement dans la sous couche du liquide épithélial de surface. Ce dernier se compose de deux couches (**Figure 38**) : une couche supérieure de mucus très visqueuse composée à 98% d'eau et une couche inférieure hydrique et peu visqueuse dite périciliaire (Wanner, Salathé, et O'Riordan 1996; Widdicombe et Widdicombe 1995).



**Figure 38. Représentation schématique de l'épithélium nasal et sa couche de mucus**

Les 3 populations cellulaires constituant l'épithélium respiratoire nasal humain sont représentées avec les cellules ciliées, les cellules basales et les cellules caliciformes (cellules sécrétrices de mucus).

Source : (Tilley *et al.* 2015)

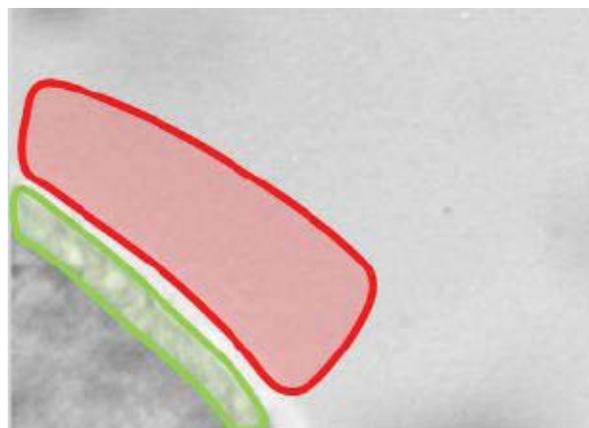
Le battement ciliaire est un mouvement asymétrique permanent et périodique dans les 3 dimensions (3D) de l'espace. La propulsion du mucus a lieu pendant le battement actif (phase « aller ») lorsque les pointes ciliaires pénètrent dans la couche de mucus pour la pousser, créant ainsi un mouvement (M. A. Chilvers et O'Callaghan 2000). Cette phase active est plus rapide que la phase retour (mouvement passif). Chez le sujet sain, la vitesse de la CMC est de l'ordre de  $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  dans la trachée et la FBC est comprise entre 10 et 15 Hz (Salathé 2007; Gheber et Priel 1994; 1997). Aujourd'hui des méthodes fiables non invasives et objectives permettent de mesurer la CMC mais elles ne sont pas toutes disponibles chez l'Homme (Bottier, Blanchon, *et al.* 2017; Bottier, Peña Fernández, *et al.* 2017).

J'ai pu utiliser un banc de VMHV pour l'ensemble des enregistrements. Il se compose :

- d'un microscope inversé Axiovert 200M (Carl Zeiss). Dans ce type de microscope, la lumière arrive sur l'échantillon par le dessus et l'observation se fait par le dessous. Cette configuration d'observation est souvent utilisée pour l'observation de cellules en culture *in vitro*.
- de deux objectifs (Carl Zeiss) : un  $\times 40$  et un  $\times 100$  à immersion en huile.
- d'une platine SMC 2009 (Märzhäuser Wetzlar), motorisée selon les axes x et y, avec un joystick.
- d'une camera haute vitesse PL-A741 (PixeLink) avec une résolution maximale de 1,3 mégapixels ( $1280 \times 1024$  pixels) qui filme en niveau de gris (8 bits). La caméra est interfacée grâce à un port FireWire au logiciel StreamPix 5 Edition SingleCamera développé par NorPix Inc (Montréal, Canada). C'est ce logiciel qui nous permet de régler la résolution d'image, la vitesse d'acquisition ainsi que la longueur des films.

L'analyse cinématique du battement ciliaire permet de définir plusieurs paramètres pouvant tous être mesurés pour évaluer de façon plus ou moins directe l'efficacité de la CMC. Six paramètres principaux seront détaillés, ils sont tous accessibles à partir du logiciel développé au sein de l'équipe et utilisé à des fins de recherches fondamentales :

- 1) La longueur des cils (en  $\mu\text{m}$ ) a été mesurée sur les cils les plus rectilignes dont la base, l'extrémité apicale et l'ensemble du trajet étaient visibles.
- 2) La FBC peut être obtenue par l'analyse temporelle du niveau de gris par transformée de Fourier rapide (FFT). Sur chaque image, le niveau de gris moyen d'une ligne de pixels (ou éventuellement d'une région) est calculé. Lorsqu'il y a un mouvement, le niveau de gris moyen de la ligne de pixels évolue au cours du temps. Une simple FFT de ce niveau de gris permet d'obtenir le spectre fréquentiel correspondant et la fréquence fondamentale de ce spectre correspond à la FBC. La FBC moyenne décrite par Papon *et al.* est de 8,9 Hz pour des sujets sains (patients sans DCP mais ayant bénéficié d'un brosseage muqueux nasosinusal) (Papon *et al.* 2012). Il est important de prendre en compte la température à laquelle les enregistrements sont effectués, car elle a un effet sur la fréquence (diminution linéaire de la FBC si l'on passe de 37°C à 25°C (Green *et al.* 1995)). Déjà utilisée par de nombreux auteurs pour l'étude de l'effet des IL sur l'épithélium, ce paramètre peu spécifique, sensible au changement de température n'a pas été choisi pour ce travail. En effet, les résultats dans la littérature concernant la FBC et la PNS sont variables : la FBC restait stable (Slater *et al.* 1996), était augmentée (Braverman *et al.* 1998) ou était significativement plus faible (Y. Y. Li *et al.* 2014) chez les patients avec une PNS par rapport à des contrôles.
- 3) L'amplitude du battement ciliaire ou la distance parcourue par la pointe du cil en une seconde lorsqu'elle est pondérée par la proportion d'amas battants est reconnue comme étant le meilleur paramètre dans la DCP (Papon *et al.* 2012). En revanche, cette analyse requiert d'extraire un cil pour ensuite faire les calculs permettant d'obtenir la valeur correspondante à chaque condition et pour minimiser le risque d'erreur, cette procédure nécessite le suivi d'un cil sur l'ensemble des images d'un cycle complet. Ainsi, 180 points par cycle doivent être déterminés par l'opérateur (FBC de 8 Hz et vitesse d'acquisition de 358 images par seconde), il faut faire les enregistrements à l'objectif x100 pour distinguer les cils entre eux et elle n'a donc pas été choisie pour ce travail.
- 4) La densité ciliaire relative (**Figure 39**) est évaluée en comparant le niveau de gris moyen du fond avec le niveau de gris de la zone contenant des cils. Les zones ciliées étant plus sombres que le fond, plus le pourcentage est élevé, plus la densité ciliaire relative est importante. Ce calcul repose sur une première approximation, les cils ne se chevauchent pas, ainsi la densité relative de cils peut être approximée par la fraction d'aire occupée par les cils. Insuffisamment spécifique et sensible pour discriminer les patients atteints de PNS des sujets contrôles, cette méthode n'a pas été choisie pour ce travail (Becaud J., Renaud M., Angely C., Filoche M., Louis B., Papon JF, Bequignon E ; *Ex vivo characterization of ciliary beating in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Soumis à Eur Respir J* 2023) .

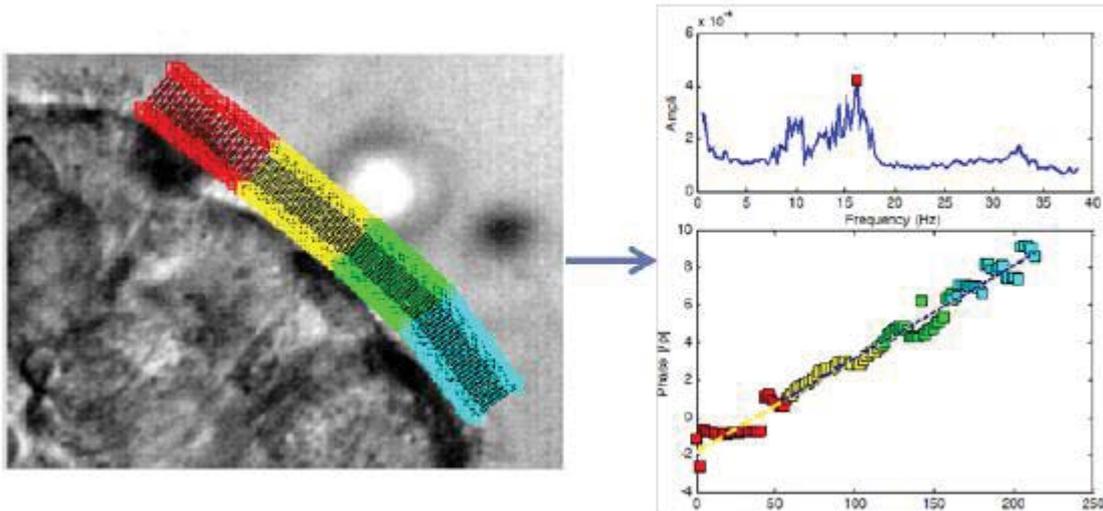


**Figure 39. Principe de la densité relative de cils.**

*La zone verte correspond à la zone ciliée et la zone rouge correspond au fond.*

*Source : (Bottier, Blanchon, et al. 2017; Bottier, Peña Fernández, et al. 2017)*

- 5) L'analyse de la LOOM en  $\mu\text{m}$  est obtenue en déduisant la variation de phase de la fréquence principale de battement le long du bord cilié. Il s'agit d'un paramètre important dans les modélisations du transport du mucus dans la littérature (Vélez-Cordero et Lauga 2013). La LOOM correspond à la variation de phase sur 100 lignes parallèles entre elles et perpendiculaires à la bordure ciliée. Ce déphasage, qui exprime le retard d'un cil dans le cycle par rapport aux cils voisins, crée une onde métachronique qui participe au mouvement du mucus. Une régression linéaire entre la position et la phase de la fréquence fondamentale (déterminée par la transformée rapide de Fourier) est effectuée pour obtenir la LOOM (**Figure 40**). Cette technique est décrite par Bottier *et al* qui a fait sa thèse d'Université dans la même équipe de recherche (Bottier, Blanchon, *et al.* 2017; Bottier, Peña Fernández, *et al.* 2017).

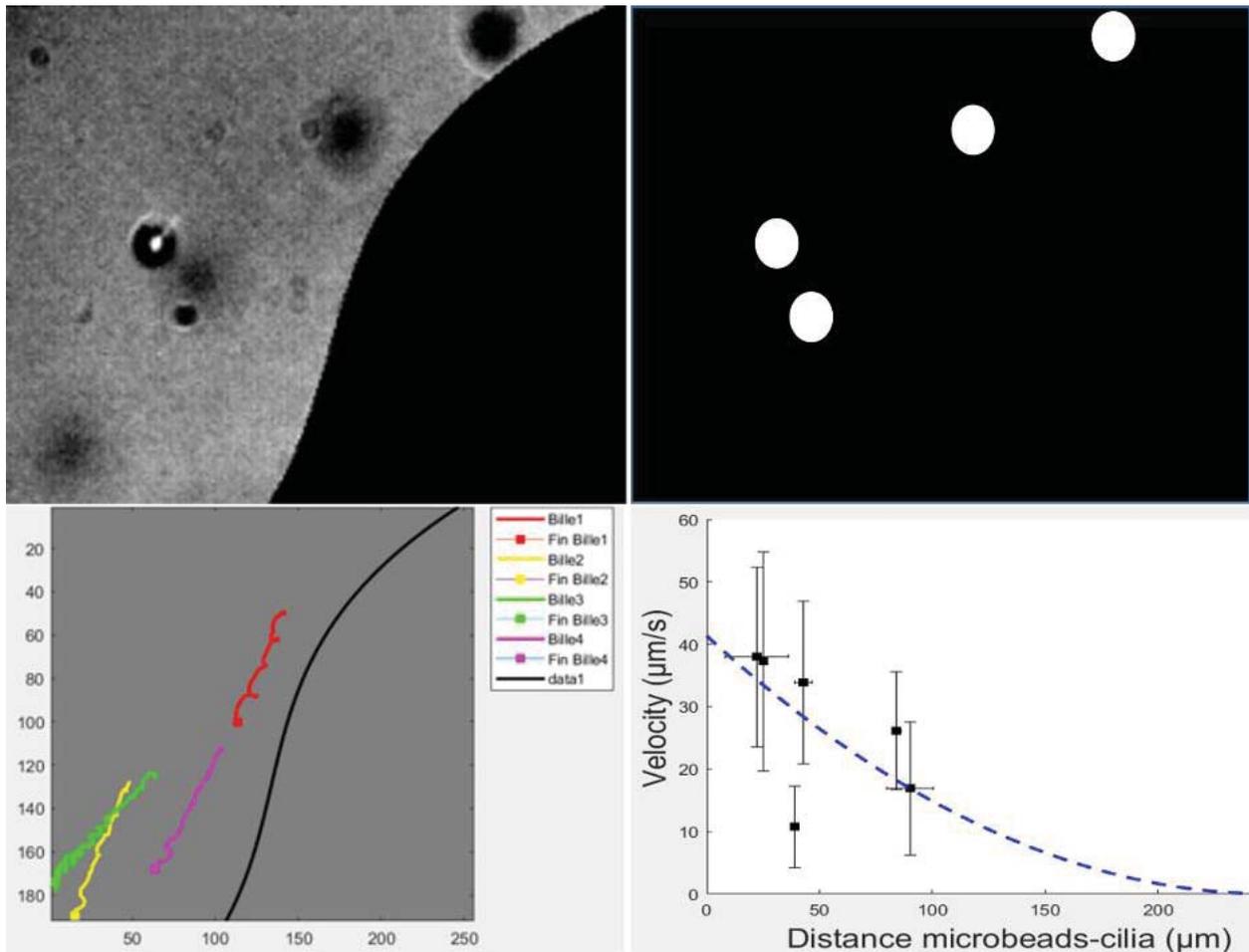


**Figure 40. Principe de la mesure de la longueur de l'onde métachrone**

*A gauche, 100 transformées rapide de Fourier (FFT) du niveau de gris des lignes parallèles le long de la bordure ciliée sont effectuées. A droite, une régression linéaire entre la position et la phase de la fréquence fondamentale (déterminée par la FFT en haut) est ensuite effectuée (en bas) pour obtenir la longueur d'onde de l'onde métachrone.*

*Source : (Bottier, Blanchon, et al. 2017; Bottier, Peña Fernández, et al. 2017)*

6) L'analyse de l'indice d'efficacité du battement ciliaire a été choisie pour ce travail sur la base de travaux de l'équipe soumis pour publication (*Becaud et al., Ex vivo characterization of ciliary beating in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*). Le protocole détaillé est disponible en annexe (**Annexe 11**). Des microbilles de polystyrène de 4,5  $\mu\text{m}$  à une concentration inférieure à 1% étaient ajoutées au sein d'une suspension de CENH ciliées. Le mélange ainsi obtenu est placé entre une lame de microscope et une lamelle couvre-objet. Les mouvements des cils étaient enregistrés à l'aide d'une caméra numérique (PixeLink A741, Ottawa, ON, Canada) à une vitesse de 358 images par seconde. Chaque film était constitué de 1800 images avec une définition de  $256 \times 192$  pixels, chaque pixel individuel représentant  $(0,32 \times 0,32) \mu\text{m}^2$  avec un objectif x40. Toutes les zones contenant des bords épithéliaux ciliés intacts et non perturbés de plus de 50  $\mu\text{m}$ , battant dans le plan de la caméra ont été enregistrés. Le logiciel interprète les films enregistrés bordure par bordure et l'analyse est semi-automatique. Ainsi, le logiciel va enregistrer la trajectoire des billes et analyser le profil de vitesse en fonction de la distance à la bordure pour estimer la contrainte de cisaillement exercée par les cils sur le fluide. La distribution de la vitesse doit avoir une forme parabolique en fonction de la distance. L'indice d'efficacité (Tau) est égal au produit de  $\mu$  (la viscosité) et de la dérivée spatiale de la vitesse. Après avoir estimé Tau, une étape manuelle de vérification des trajectoires de billes est nécessaire pour éviter tout biais dans l'analyse automatisée des différences de contrastes. Chaque groupe de trois films est ainsi relu par un autre logiciel (ParabolePost, Créteil, France) également programmé sur la plateforme Matlab pour pouvoir corriger les erreurs d'interprétation (**Figure 41**). Par exemple, l'enregistrement d'un mouvement qui ne correspond pas à une bille, mais au déplacement d'un fragment de bordure, venant parasiter l'enregistrement, sera supprimé en postproduction. L'indice d'efficacité du battement ciliaire a été décrit par Bottier *et al.* et il s'agit d'un paramètre spécifique de la PNS (**Figure 42**) (Bottier, Blanchon, *et al.* 2017; Bottier, Peña Fernández, *et al.* 2017). Le logiciel d'analyse qui permet d'estimer l'indice d'efficacité a été développé par l'équipe sur la plateforme Matlab (Stream2D, Créteil, France). La vitesse des microbilles a été utilisée comme marqueur du flux généré par le battement ciliaire afin d'évaluer la contrainte de cisaillement induite par les cils sur le fluide. L'indice d'efficacité du battement ciliaire s'exprime en mPa. Cet outil, fiable et reproductible, reste du domaine de la recherche fondamentale et n'est pas encore utilisé en routine clinique, notamment car il est très chronophage. Dans le cadre des mes travaux sur l'épithélium pour pouvoir extraire de façon fiable et reproductible un indice d'efficacité propre à chaque condition, trois films étaient réalisés pour chaque bordure ciliées et trois bordures étaient choisies au hasard parmi l'ensemble des bordures ciliées présentes dans la suspension cellulaire. Ainsi pour un puits où sont cultivées des CENH correspondant à une condition chez un patient, neuf films étaient réalisés, soit 2010 films au total pour mes travaux. En effet, pour l'étude de l'effet de l'OSM sur l'indice d'efficacité du battement ciliaire, 74 puits ont été utilisés en culture pour un total de 666 films. Pour l'étude de l'effet de l'IL-4, de l'IL-13 et du dupilumab sur l'indice d'efficacité du battement ciliaire, 156 puits ont été utilisés en culture (84 pour l'étude de l'IL-4 et de l'IL-13 puis 72 pour l'étude des du dupilumab), soit 1404 films.

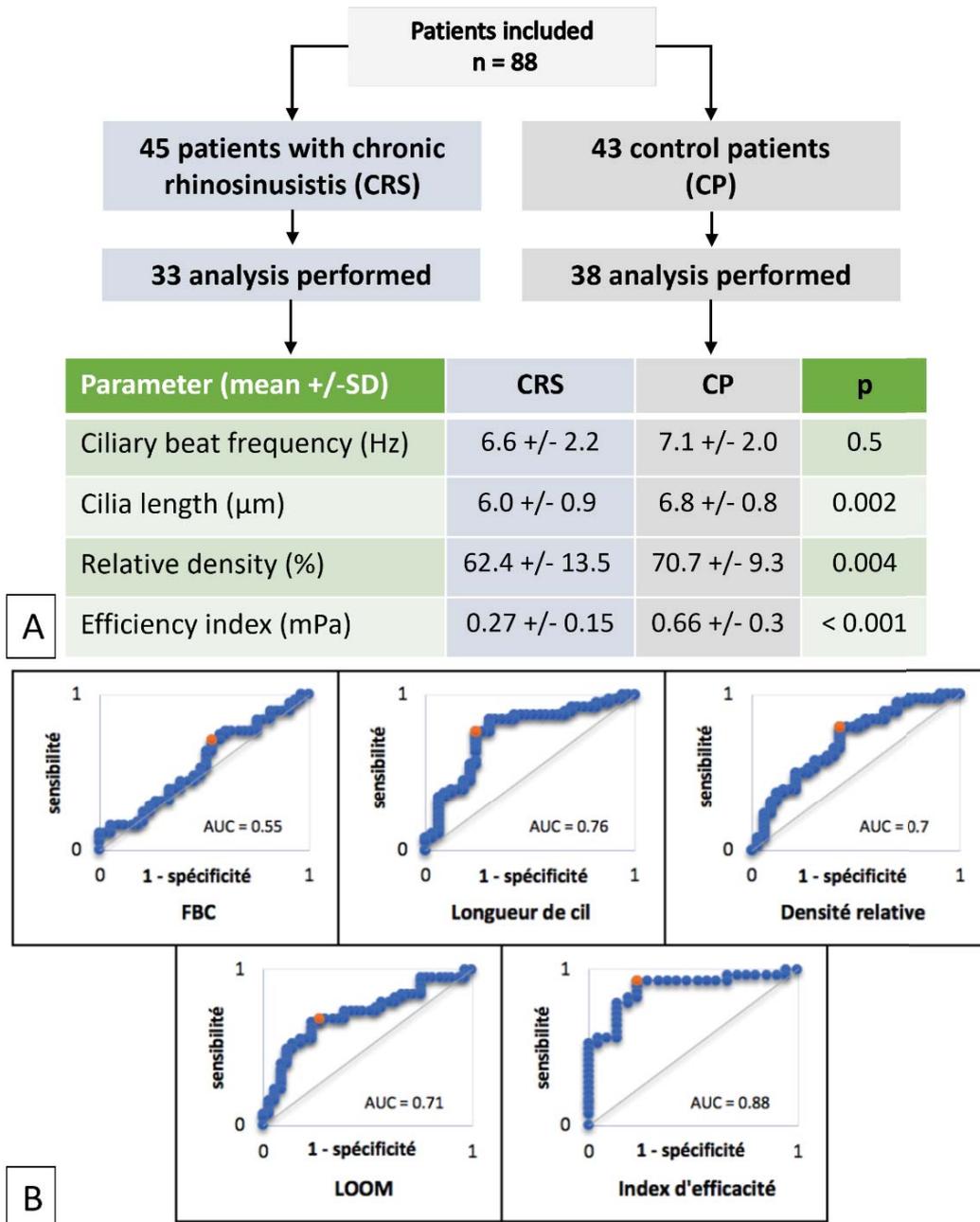


$$\tau_w = \mu \left. \frac{\partial U}{\partial y} \right|_{y=0}$$

**Figure 41. Equation de mesure de l'index d'efficacité du battement ciliaire (Stream 2D)**

Le déplacement des microbilles de polystyrène est enregistré, la différence de contraste permet d'identifier la bordure ciliée, puis les billes qui apparaissent comme des ronds blancs. La trajectoire de chaque bille est modélisée avec une vitesse et une distance à la barrière permettant d'estimer l'index d'efficacité mucociliaire selon la formule dédiée. Tau (l'index d'efficacité) est le produit de la viscosité ( $\mu$ ) et de la dérivée spatiale de la vitesse. Abréviations :  $\tau_w$ , Index d'efficacité mucociliaire ;  $\mu$ , viscosité

Source : (Bottier, Blanchon, et al. 2017; Bottier, Peña Fernández, et al. 2017)



**Figure 42. Comparaison des différents paramètres d'analyse quantitative du battement ciliaire entre les groupes RSC et contrôle**

(A) Moyenne +/- SD des différents paramètres entre les deux groupes ; (B) Courbe ROC des couples sensibilité-spécificité des différents paramètres de mesures de l'efficacité du battement ciliaire avec l'aire sous la courbe de chacun des différents paramètres permettant de les comparer.

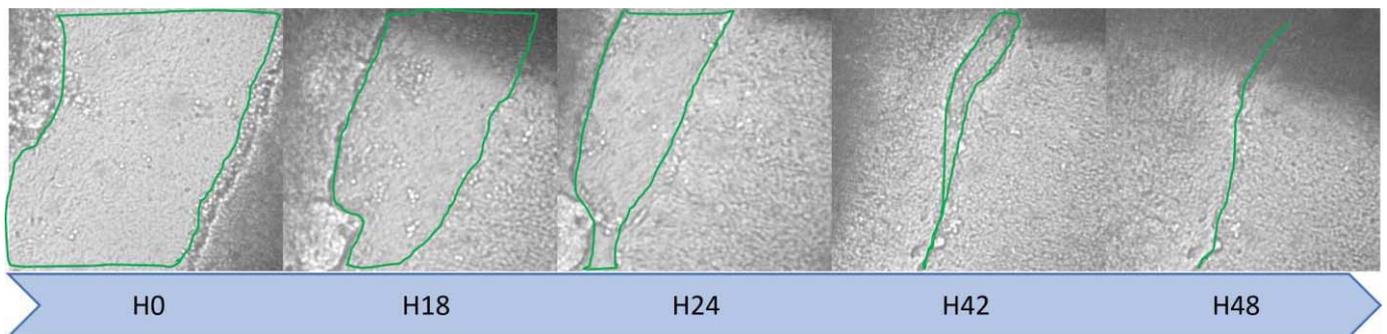
Abréviations : AUC, Aire sous la courbe ; CP, Patients Contrôles ; SD, Déviation Standard.

Source : Becaud J., Renaud M., Angely C., Filoche M., Louis B., Papon JF, Bequignon E ; *Ex vivo characterization of ciliary beating in chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. Soumis à *Eur Respir J* 2023

Toutes les analyses sont réalisées à une température contrôlée de 20 à 25°C et un microscope inversé en fond clair associé à un objectif x40 est utilisé pour la mesure de l'ensemble des paramètres à l'exception de la longueur des cils (objectif x100). En raison de sa spécificité et de son originalité, c'est l'analyse de l'indice d'efficacité de la CMC qui a été choisie pour ce travail de recherche sur l'OSM, l'IL-4, l'IL-13 et le dupilumab.

#### 4.4. La réparation tissulaire

Pour évaluer les capacités de réparation épithéliale des CENH *in vitro*, un modèle de blessure mécanique ayant déjà fait la preuve de sa reproductibilité a été adapté et réalisé sur les mêmes cultures primaires de CENH que le modèle en IAL décrit précédemment dans ces méthodes. Le protocole détaillé est accessible en annexe (**Annexe 12**). Une blessure linéaire contrôlée de 12mm de long \* 1,4mm était réalisée en grattant les CENH à l'aide d'une pointe de pipette, suivie d'un lavage intensif pour éliminer les débris cellulaires (3\*PBS<sup>+/+</sup>). Ensuite, pour déterminer la vitesse de réparation épithéliale après blessures, des images en time-lapse étaient prises à intervalles réguliers avec un microscope inversé (Zeiss, Axiovert200M, France) équipé d'un objectif ×10 sur une période de 48 h, en fonction du moment de fermeture de la blessure (18h, 24h, 42h, et 48h après réalisation de la blessure) (**Figure 43**). La surface de la blessure était ensuite quantifiée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Image J, v1.53k). La vitesse de fermeture de la blessure était mesurée comme la proportion de fermeture de la blessure en calculant le rapport entre la surface de la zone blessée à chaque temps et la surface de la zone blessée initiale. La reproductibilité de la blessure était évaluée en comparant les surfaces initiales des blessures pour chaque concentration testée. Dans le travail mené sur l'OSM, la fermeture de la blessure en présence d'OSM était comparée au contrôle non stimulé (milieu de culture sans cytokine). Ainsi, immédiatement après la blessure, les CENH étaient exposées à un milieu DMEM-HAM-F12-Pénicilline-Streptomycine-Fungizone-Gentamycine sans OSM ou avec OSM à différentes concentrations (1 ng/ml, 10 ng/ml et 100 ng/ml). Chaque concentration d'OSM était testée en double pour chaque culture provenant d'un seul patient. Le même protocole était réalisé pour l'étude des effets de l'IL-4, de l'IL-13 et du dupilumab.



**Figure 43. Représentation du modèle de blessure**

*Blessure linéaire de l'épithélium entraînant une rupture de la membrane basale (H0). Ensuite des photos sont prises régulièrement pour évaluer la vitesse de réparation. A chaque fois, la surface blessée est enregistrée.*

## 5. Accord du comité scientifique et éthique

### 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>re</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

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

---

## 6. Article IL-6 & OSM

Cette étude a fait l'objet d'une communication orale au congrès national de la société française d'otorhinolaryngologie et de chirurgie cervico-faciale internationale (SFORL & CCF) lors du congrès annuel à Marseille en octobre 2022, mais aussi au congrès international de *l'International Forum of Otorhinolaryngology Society* (IFOS) à Dubai en janvier 2023 ainsi que d'un article publié dans *l'IJMS*. Il sera également présenté lors du congrès européen de *l'European Rhinologic Society* (ERS) à Sofia en juin 2023 où il a été déposé pour le prix de la recherche délivré par l'ERS et *l'International Society of Inflammation and Allergy of the Nose* (ISIAN), the *ERS Research Grant Young Researcher for Work*.

### Résumé Français de l'article

La polypose nasosinusienne (PNS) est une maladie inflammatoire de type 2, impliquant plusieurs cytokines et associée à un dysfonctionnement des cellules épithéliales. L'Oncostatin M (OSM) (appartenant à la famille des interleukines (IL)-6) pourrait être un facteur clé du dysfonctionnement de la barrière épithéliale. Nous avons donc étudié la présence d'OSM et d'IL-6, et le profil d'expression des jonctions serrées (JS) dans les polypes de patients atteints de PNS et de témoins, en utilisant la *reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR) et le western blot. Ensuite, leur rôle éventuel sur la barrière épithéliale a été évalué *in vitro* au sein de 27 cultures primaires différentes de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) en mesurant l'expression des JS et la résistance électrique transépithéliale (RETE) avec ou sans OSM ou IL-6 (1, 10 et 100 ng/mL). L'effet sur l'efficacité du battement ciliaire a été évalué par vidéomicroscopie à haute vitesse et sur les mécanismes de réparation épithéliale à l'aide d'un modèle de blessure avec ou sans OSM. L'OSM et l'IL-6 étaient tous deux surexprimés, et l'expression des protéines de JS (ZO-1 et occludine) était diminuée dans les polypes nasaux par rapport à la muqueuse des patients contrôles. L'OSM (100 ng/mL), mais pas l'IL-6, a induit une diminution significative de l'expression des protéines de JS, de la RETE et de l'efficacité du battement ciliaire dans les CENH *in vitro*. Après 24h, la vitesse de réparation épithéliale après blessure était significativement plus élevée dans les CENH stimulées par l'OSM 100 ng/mL. Ces résultats suggèrent que l'OSM pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique dans la PNS et ainsi servir pour le développement de nouveaux AcM.



Article

---

# Oncostatin M Contributes to Airway Epithelial Cell Dysfunction in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps

---

Florent Carsuzaa, Emilie Bequignon, Sophie Bartier, André Coste, Xavier Dufour, Matthieu Binaud, Jean Claude Lecron, Bruno Louis, Stéphane Tringali, Laure Favot et al.

Special Issue

OSM/OSMR and Interleukin 6 Family Cytokines in Physiological and Pathological Condition 2.0

Edited by  
Dr. Francesca Lantieri





Article

# Oncostatin M Contributes to Airway Epithelial Cell Dysfunction in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps

Florent Carsuzaa <sup>1,2</sup> , Emilie Bequignon <sup>3,4,5</sup>, Sophie Bartier <sup>4,5,6</sup>, André Coste <sup>3,4,5</sup>, Xavier Dufour <sup>1,2</sup>, Matthieu Binaud <sup>1,7</sup>, Jean Claude Lecron <sup>1,7</sup>, Bruno Louis <sup>4,5</sup>, Stéphane Tringali <sup>8,9,10</sup> , Laure Favot <sup>1</sup> and Maxime Fieux <sup>4,5,8,9,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), UR15560, Université de Poitiers, F-86000 Poitiers, France
- <sup>2</sup> Service ORL, Chirurgie Cervico-Maxillo-Faciale et Audiophonologie, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, F-86000 Poitiers, France
- <sup>3</sup> Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale, F-94010 Créteil, France
- <sup>4</sup> CNRS EMR 7000, F-94010 Créteil, France
- <sup>5</sup> INSERM, IMRB, Univ Paris Est Creteil, F-94010 Créteil, France
- <sup>6</sup> Service d'ORL, de Chirurgie Cervico Faciale, Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, F-94010 Créteil, France
- <sup>7</sup> Service Immunologie et Inflammation, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, F-86021 Poitiers, France
- <sup>8</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Service d'ORL, d'Otoreurochirurgie et de Chirurgie Cervico-Faciale, F-69310 Pierre Bénite, France
- <sup>9</sup> Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud-Charles Mérieux, Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69003 Lyon, France
- <sup>10</sup> UMR 5305, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, 7 Passage du Vercors, CEDEX 07, F-69367 Lyon, France
- \* Correspondence: maxime.fieux@chu-lyon.fr; Tel.: +33-4-72-66-64-15



**Citation:** Carsuzaa, F.; Bequignon, E.; Bartier, S.; Coste, A.; Dufour, X.; Binaud, M.; Lecron, J.C.; Louis, B.; Tringali, S.; Favot, L.; et al. Oncostatin M Contributes to Airway Epithelial Cell Dysfunction in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6094. <https://doi.org/10.3390/ijms24076094>

Academic Editor: Francesca Lantieri

Received: 4 October 2022

Revised: 18 March 2023

Accepted: 22 March 2023

Published: 23 March 2023



**Copyright:** © 2023 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a typical type-2 inflammation involving several cytokines and is associated with epithelial cell dysfunction. Oncostatin M (OSM) (belonging to the interleukin(IL)-6 family) could be a key driver of epithelial barrier dysfunction. Therefore, we investigated the presence of OSM and IL-6 and the expression pattern of tight junctions (TJs) in the nasal tissue of CRSwNP patients and controls using reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting. Then, their potential role in the epithelial barrier was evaluated in vitro in 27 different primary cultures of human nasal epithelial cells (HNECs) by measuring TJ expression and transepithelial electric resistance (TEER) with or without OSM or IL-6 (1, 10, and 100 ng/mL). The effect on ciliary beating efficiency was evaluated by high-speed videomicroscopy and on repair mechanisms with a wound healing model with or without OSM. OSM and IL-6 were both overexpressed, and TJ (ZO-1 and occludin) expression was decreased in the nasal polyps compared to the control mucosa. OSM (100 ng/mL) but not IL-6 induced a significant decrease in TJ expression, TEER, and ciliary beating efficiency in HNECs. After 24 h, the wound repair rate was significantly higher in OSM-stimulated HNECs at 100 ng/mL. These results suggest that OSM could become a new target for monoclonal antibodies.

**Keywords:** nasal epithelium; OSM; IL-6; ciliary beating efficiency; epithelial electric resistance; tight junctions; repair rate; CRSwNP; primary culture

## 1. Introduction

Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by long-term symptoms, such as nasal obstruction and loss of smell, all of which negatively affect patients' health-related quality of life (QOL) [1] and affect up to 11% of the population of Western Europe [2]. It has garnered considerable public

health concern owing to its high incidence and unsatisfactory treatment outcomes. In the latter, 85% of CRSwNP cases reveal a type 2 inflammatory pattern [3], which may contribute not only to the chronic inflammatory state of the sinonasal mucosa but also to tissue remodeling and growth of nasal polyps. The characteristics of airway remodeling include subepithelial fibrosis along with epithelial damage, goblet cell metaplasia, edema, and the loss of differentiation of ciliated cells [1]. The nasal epithelium serves as a mechanical barrier to protect against environmental insults, such as air pollution, viruses, and bacteria, as well as allergens. Patho-physiologically, the damaged epithelium responds to injury caused by environmental factors by inducing the production of Th2-promoting cytokines such as IL-25, IL-33, and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) [4]. It has been suggested that the epithelium (in CRSwNP) could be more susceptible to environmental insults due to the inability of nasal polyp epithelial cells to maintain barrier function [5]. To ensure this function, neighboring epithelial cells are connected to one another via tight junctions (TJs) mostly constituted by occludin and zonula-occludens (ZO-1) [6,7]. TJs can be considered gatekeepers whose alteration could contribute to both the aggravation of inflammation-related tissue damage or the resolution of inflammation through drainage [8]. In CRSwNP patients, loss of TJ function and/or expression has been observed [5], and when the epithelial barrier is disrupted, instead of a self-limited immunodefensive response, it results in a chronic inflammatory response that fails to resolve [9–12].

Although CRSwNP pathophysiology has not yet been clearly identified, chronic type 2 inflammation and epithelial dysfunction appear to be key factors in the formation of nasal polyps, involving numerous cytokines from the interleukin (IL)-6 family [1,13–18]. Oncostatin M (OSM) is a multifunctional cytokine belonging to the IL-6 family [18]. OSM has a proinflammatory effect reported on tissues such as the lungs [19], joints, or liver [20] and has the capacity to target skin cells more insensitively than IL-6 [21,22], as described in vitro in primary culture of keratinocytes and in reconstructed human epidermis models [23,24]. OSM protein and OSM mRNA are overexpressed in CRSwNP compared with controls [11] and seem to act both on the fibroblastic and epithelial components of polyp tissues [25] as well as on TJs [11]. IL-6 is mostly regarded as a proinflammatory cytokine, but there are numerous examples of protective and regenerative functions of this cytokine [26]. A recent report demonstrated elevated IL-6 protein levels in the polyp tissue of patients with CRSwNP [27]. In human nasal epithelial cells (HNECs), IL-6 increases ciliary beat frequency and accelerates airway wound repair [28]. However, the involvement of OSM and IL-6 in the pathogenesis of CRSwNP remains largely unknown [25,29].

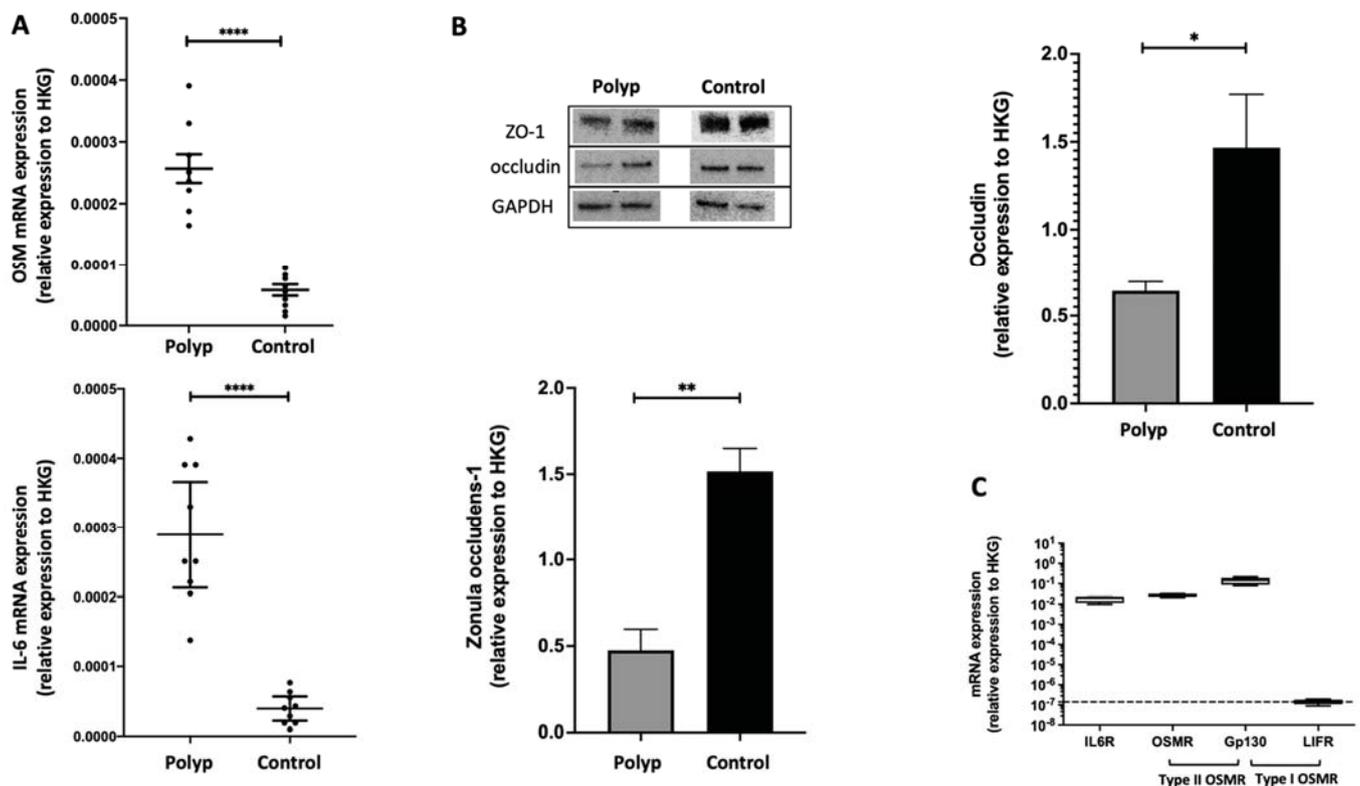
In the present study, we investigated their potential role in epithelial cell dysfunction in CRSwNP. First, we analyzed IL-6 and OSM expression, the secretion of OSM in outer space, and epithelial TJ expression patterns in nasal polyps. Then, on HNECs at the air-liquid interface (ALI) in vitro, we analyzed (i) the expression pattern of IL-6 and OSM receptors, (ii) the effect of IL-6 and OSM on TJ expression and transepithelial electric resistance (TEER), and (iii) the effect of OSM on ciliary beating efficiency and wound repair capacity.

## 2. Results

### 2.1. In Nasal Polyps, OSM Was Secreted and Overexpressed, and Epithelial TJs Were Altered

In nasal polyps and in non-inflammatory nasal mucosa, we compared the expression of OSM and IL-6 in RT-qPCR. OSM and IL-6 were overexpressed in the nasal polyps when compared to the control mucosa ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1A).

The presence of OSM in supernatants of 48 h cultured polyps from patients with CRSwNP was assessed by ELISA. The mean OSM concentrations were  $192 \pm 75$  pg/mL [120–290 pg/mL],  $n = 5$  (Figure S1). We also studied by Western blot the ex vivo expression of epithelial TJs occludin and ZO-1, known to be implicated in the human nasal epithelial barrier. We reported a decrease in the expression of occludin ( $p = 0.0159$ ) and ZO-1 ( $p = 0.0079$ ) in nasal polyps when compared to non-inflammatory nasal mucosa (Figure 1B).



**Figure 1.** OSM and IL-6 were overexpressed, and epithelial TJs were altered compared to non-inflammatory nasal mucosa. The ex vivo expression of OSM and IL-6 were analyzed by RT-qPCR in nasal polyps and in non-inflammatory nasal mucosa (controls) ( $n = 9$ ) (A) and expression of occludin and ZO-1 were analyzed by Western blotting ( $n = 5$ ) (B), both using GAPDH as a housekeeping gene (HKG) to normalize gene and protein expression. OSM and IL-6 were overexpressed in nasal polyps, and occludin and ZO-1 were underexpressed. The type II OSM receptor and IL-6 receptor were expressed in nasal-polyp-derived HNECs ( $n = 5$ ) (C). The  $y$ -axis represents the relative expression normalized to HKG. \*  $p = 0.0159$ ; \*\*  $p = 0.0079$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

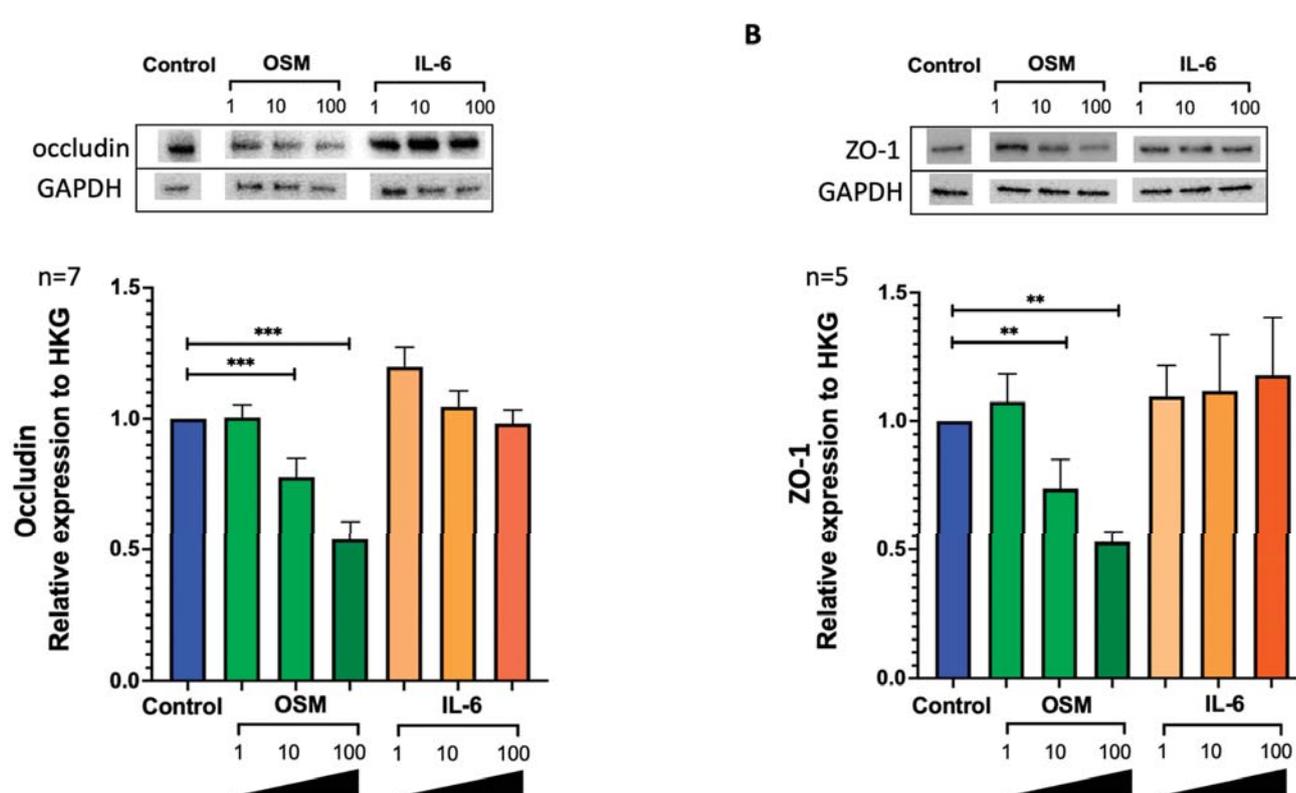
### 2.2. The IL-6 Receptor and Type II OSM Receptor Were Expressed in HNEC

To show that OSM and IL-6 can have a direct effect on epithelial cells, we evaluated the in vitro expression of the two interleukin receptors in human nasal epithelial cells. We confirmed the mRNA expression of the IL-6 receptor (comprising IL-6R and gp130 chains) and the type II OSM receptor (comprising OSMR and gp130 chains) but not the type I OSM receptor (comprising LIFR and gp130 chains) in nasal polyp-derived HNECs (Figure 1C).

### 2.3. OSM but Not IL-6 Decreased Occludin and ZO-1 Expression in HNEC

To evaluate the in vitro effect of OSM and IL-6 on epithelial cell barrier function, we stimulated HNECs with increasing concentrations of OSM or IL-6. In OSM-stimulated HNECs, occludin was underexpressed at 10 and 100 ng/mL ( $p = 0.0006$ ) compared with the control. There was no change in occludin expression compared with the control in IL-6-stimulated HNECs (Figure 2A). Similarly, in OSM-stimulated HNECs, ZO-1 was underexpressed at 10 and 100 ng/mL ( $p = 0.0079$ ), whereas IL-6 had no action when compared with the control (Figure 2B). ALI cultures of HNECs stimulated on day 21 with 10 and 100 ng/mL OSM for 48 h showed a decrease in TJ labeling, whereas no significant changes were observed with IL-6. ZO-1 (red) and actin (green) expression after immunolabeling and nuclear DAPI labeling (blue) with stimulation by OSM at 1 ng/mL (A), 10 ng/mL (B), and 100 ng/mL (C) and IL-6 at 1 ng/mL (D), IL-6 at 10 ng/mL (E), IL-6 at 100 ng/mL (F), or without any stimulation (G and H, for ZO-1 and actin, respectively) are shown in Figure 3. Details regarding actin cytoskeleton organization under the different

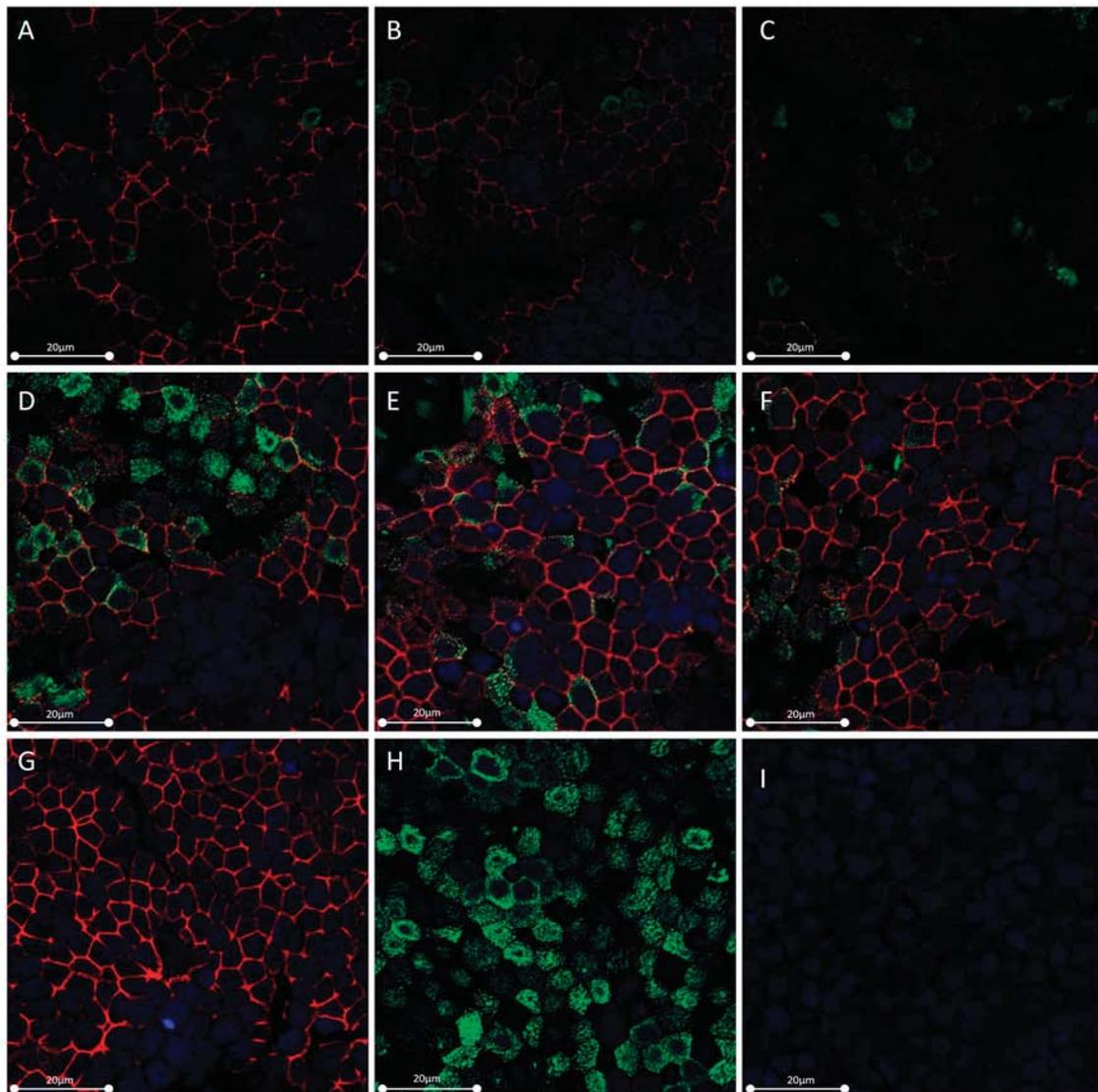
conditions of the experiment are available in the Supplementary Figures (Figure S2). The actin cytoskeleton organization was the same in the control, under IL-6 for all concentrations tested and under OSM 1 or 10 ng/mL stimulation, whereas OSM 100 ng/mL showed actin stress fibers at the apical pole of the cell.



**Figure 2.** OSM but not IL-6 reduced the expression of occludin and ZO-1 in HNECs. Occludin ( $n = 7$ ) and ZO-1 ( $n = 5$ ) relative expression at the protein level were analyzed by Western blotting using GAPDH as HKG to normalize protein expression (A,B). The  $y$ -axis represents the relative expression normalized to HKG. Comparisons were made between the groups \*\*  $p = 0.0079$ ; \*\*\*  $p = 0.0006$ .

#### 2.4. OSM but Not IL-6 Decreased TEER in HNEC

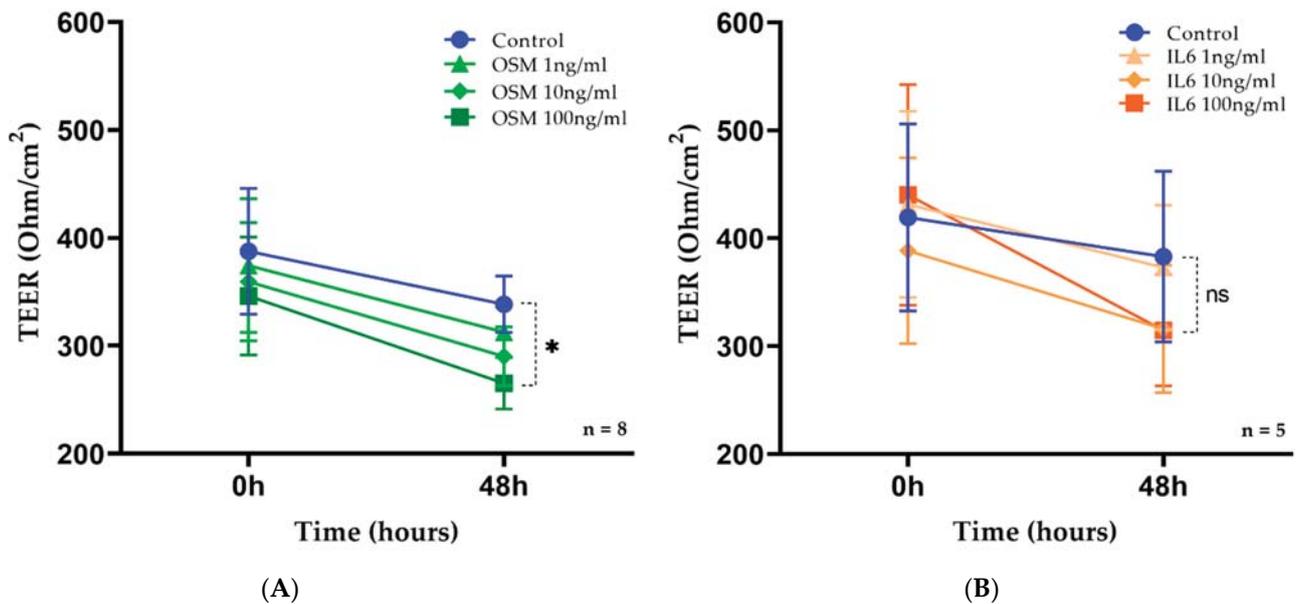
To evaluate the *in vitro* effect of OSM/IL-6 on epithelial cell permeability, electrical resistance across the epithelial cell barrier was obtained by TEER measurements with cytokine stimulation (either OSM or IL-6) at various concentrations (1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL) and without cytokine stimulation (unstimulated controls). The baseline TEER measurement across all culture wells used for analysis was  $367 \pm 156$  ohms/cm<sup>2</sup> (mean  $\pm$  standard error) ( $n = 8$ , 81 wells, Figure 4A) prior to OSM exposure, and  $430 \pm 206$  ohms/cm<sup>2</sup> ( $n = 5$ , 39 wells, Figure 4B) prior to IL-6 exposure. Wells with a baseline TEER less than 200 ohms/cm<sup>2</sup> were excluded. The control well experiments showed a mild decrease in TEER over the 48 h cytokine exposure with TEER at 87.3% of baseline values for OSM stimulation (Figure 4A) and 83.4% of baseline values for IL-6 stimulation (Figure 4B). After 48 h of cytokine exposure, OSM at 100 ng/mL exposure demonstrated a significant decrease in TEER (76.7% of baseline values,  $265 \pm 68$  ohms/cm<sup>2</sup> at 48 h vs.  $346 \pm 155$  ohms/cm<sup>2</sup> at baseline,  $p = 0.049$ ) (Figure 4A). No significant result was observed at 48 h for 1 ng/mL (83.5% of the baseline value) and 10 ng/mL (80.7% of the baseline value) OSM or IL-6 at all concentrations tested (Figure 4B) when compared with the unstimulated controls.



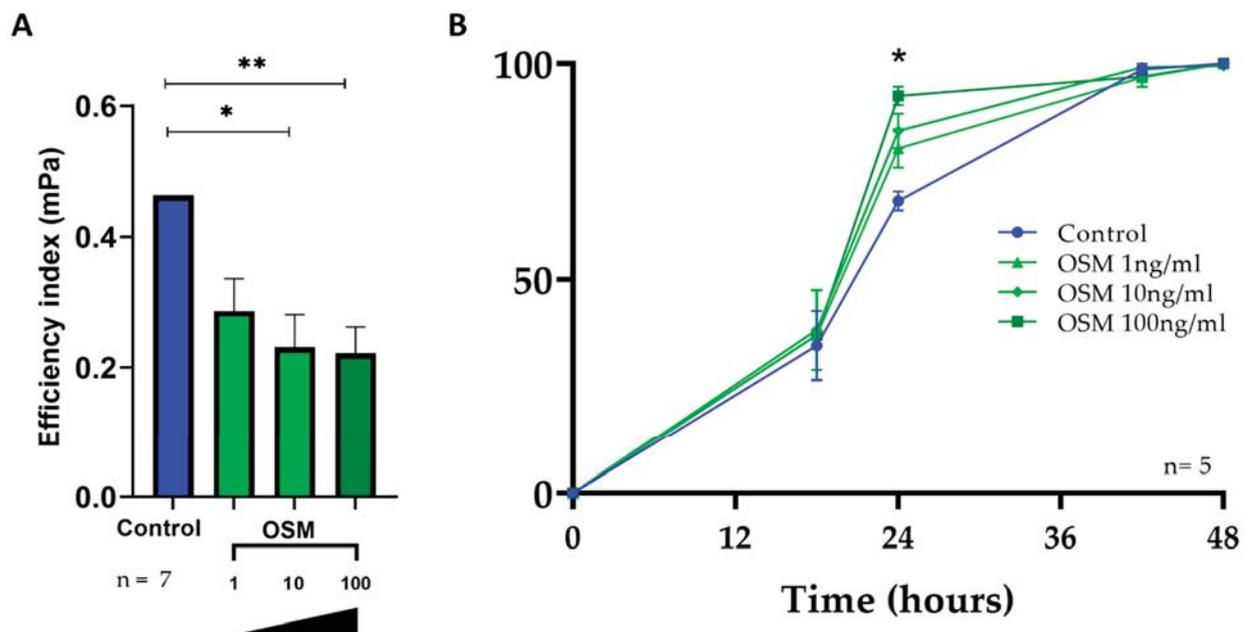
**Figure 3.** OSM but not IL-6 reduced the expression of ZO-1 in HNECs. ALI cultures of HNECs were stimulated on day 21 with OSM or IL-6 1, 10, and 100 ng/mL for 48 h. ZO-1 (red) and actin (green) expression after immunolabeling and nuclear DAPI labeling (blue) with stimulation by OSM at 1 ng/mL (A), 10 ng/mL (B), and 100 ng/mL (C), and IL-6 at 1 ng/mL (D), IL-6 at 10 ng/mL (E), IL-6 at 100 ng/mL (F), or without any stimulation (G,H), for ZO-1 and actin, respectively, are shown. A negative control without a primary antibody or rhodamine–phalloidin was performed (I).

### 2.5. OSM Decreased Ciliary Beating Efficiency in HNEC

The effect of IL-6 on ciliary beating has already been described in a previous study [28]. The in vitro dose-response effect of OSM on ciliary beating efficiency was evaluated in 7 independent primary cultures corresponding to 74 wells (OSM was tested at various concentrations, 1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL). After 48 h of stimulation, the mean ciliary efficiency index was  $0.433 \text{ mPa} \pm 0.20$  in the control wells, and no significant difference was observed with 1 ng/mL OSM ( $0.324 \text{ mPa}$ ,  $p = 0.138$ ) (Figure 5A). However, 10 ng/mL and 100 ng/mL OSM significantly reduced the mean ciliary efficiency index when compared with the unstimulated control ( $0.231 \text{ mPa} \pm 0.19$  vs.  $0.433 \text{ mPa} \pm 0.20$ ,  $p < 0.0001$  and  $0.227 \text{ mPa} \pm 0.13$  vs.  $0.433 \text{ mPa} \pm 0.20$ ,  $p < 0.0001$ , respectively, Figure 5A).



**Figure 4.** OSM but not IL-6 decreased TEER in HNECs. ALI cultures of HNECs were stimulated on day 21 with OSM or IL-6 1, 10, and 100 ng/mL for 48 h and compared to the unstimulated cultures. TEER measurements in unstimulated controls (blue), OSM 1 ng/mL (light green), OSM 10 ng/mL (green), and OSM 100 ng/mL (dark green), and IL-6 1 ng/mL (light orange), IL-6 10 ng/mL (orange), and IL-6 100 ng/mL (dark orange), were expressed in Ohms/cm<sup>2</sup>. OSM at 100 ng/mL exposure demonstrated a significant decrease in TEER (A) whereas IL-6 had no effect (B). Data are presented as the change in TEER measurement (Ohm/cm<sup>2</sup>) between the baseline and after the 48 h cytokine exposure. \*  $p = 0.049$ ; “ns” indicates  $p > 0.05$  between IL-6 stimulated wells and controls.



**Figure 5.** OSM decreased ciliary beating efficiency and increased the in vitro repair rate at 24 h. (A) The ciliary beating efficiency (mPa) was evaluated after 48 h of OSM stimulation at various concentrations (1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL) and compared with the unstimulated controls (n = 7). Stimulation of HNECs with OSM at 10 and 100 ng/mL decreased ciliary beating efficiency.

\*  $p < 0.0001$ , and \*\*  $p < 0.0001$ . (B) The repair rate was evaluated as the proportion of the wounded area closed at each time point for OSM stimulated wells (either 1 ng/mL, 10 ng/mL, or 100 ng/mL) and compared to one of unstimulated control wells ( $n = 5$ ). Stimulation of HNECs with OSM at 100 ng/mL increased the wound repair rate. \* Indicates statistical significance between the control and OSM 100 ng/mL at 24 h,  $p = 0.016$ .

### 2.6. OSM Accelerated Wound Repair in HNEC

Dysfunction of the repair of the damaged epithelial barrier has been implicated in the pathogenesis of nasal polyps. Our hypothesis was that among the inflammatory cytokines involved in nasal polyps, OSM and IL-6 could alter epithelial repair mechanisms. The effect of IL-6 on wound repair has already been described in a previous study [28]. The in vitro effect of OSM on wound closure was evaluated in 5 independent primary cultures corresponding to 35 wells that were wounded (OSM-1:  $n = 10$ , OSM-10:  $n = 10$ , OSM-100:  $n = 10$ , and unstimulated controls:  $n = 5$ ). There was no significant difference between the initial wound areas according to each tested condition ( $219.103 \pm 47.10^3$  pixels for unstimulated controls vs.  $227.10^3 \pm 35.10^3$  pixels for OSM stimulated wells;  $p = 0.299$ ). As shown in Figure 5B, after 18 h, no significant effect on the wound repair rate was observed. After 24 h, the 100 ng/mL OSM stimulated group had a higher repair rate than the unstimulated control group ( $90.2 \pm 9.5\%$  vs.  $72.2 \pm 9.6\%$ ,  $p = 0.016$ , Figure 5B). After 44 h and 48 h, no significant effect on the wound repair rate was observed.

## 3. Discussion

In the present study, we first observed that the type II OSM receptor and IL-6 receptor were expressed in HNECs. Then, we found that after IL-6 or OSM stimulation, only OSM had an effect on epithelial barrier function. OSM decreased TJ expression (ZO-1 and occludin), TEER, and ciliary beating efficiency. OSM (such as IL-6 as previously described [28]) also induced dysfunction of the repair mechanism with an increased wound repair rate.

Novel therapies to improve disease control are needed to spare CRSwNP patients from systemic corticosteroids and repeated sinus surgery. Monoclonal antibodies (mAbs) directed against IgE (omalizumab) or cytokines such as IL-5 (mepolizumab) or IL-4/IL-13 receptor (dupilumab) have been tested as innovative therapeutic approaches for CRSwNP. Five randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials demonstrated the efficacy and safety of mAbs [30–32]. Improving the knowledge of the different endotypes of CRSwNP should provide insight for determining appropriate current and new therapies [33–36]. Kim et al. concluded that endotypes depend on epithelial barrier function and epithelial cytokines [34]. Although the effect of IL-4/IL-13 and IL-5 on nasal epithelial repair has already been shown [37], the role of OSM in HNECs has been poorly studied. Pothoven et al. only showed an increase in epithelial permeability with OSM stimulation [11]. In the present study, we chose to investigate the specific role of OSM in HNECs as a potential target for new mAbs. Our hypothesis was that among the inflammatory cytokines involved in nasal polyps, some of the IL-6 cytokine family [18] could alter epithelial repair mechanisms. OSM was selected because it is a pleiotropic cytokine from the same family of IL-6 and has been shown to be more potent than IL-6 in other models, such as skin or liver models [20,23]. IL-6 has been shown to accelerate the wound closure rate in HNECs [28], and OSM could therefore play a key role in the dysregulation of repair mechanisms. We believe that in vitro wound healing is only affected by OSM after 24 h of treatment for two main reasons. First, there was a delay before the healing process started; at 12 h, wound repair was slowly initiated, which made it impossible to see a difference between the cytokine exposures (OSM 1, 10, or 100 ng/mL) and the control wells. Second, after 36 h, all wells were completely healed, including the control. Therefore, only at 24 h was the wound repair rate significantly different between the controls and the 100 ng/mL OSM group. Various in vitro models of epithelial wounding have shown that poorly differentiated cells migrate in the airways without proliferating [38–40]. There are two steps described in wound healing: first, proliferation of basal cells, predominant in

the wounded area at the beginning, and then, migration and differentiation of epithelial cells leading to wound closure, as shown by Lazard et al. [41]. This process involves attachment and turnover of TJs. Therefore, their alterations impact cell migration and epithelial wound healing [38–40]. These results are consistent with our results regarding the wound repair rate after OSM exposure. In nasal polyps, a defective epithelial barrier has been reported with decreased tissue resistance and decreased expression of TJ proteins [5]. A rupture of both the epithelial continuity and the basement membrane is one of the numerous hypotheses underlying the formation of polyps. However, the mechanisms leading to epithelial cell dysfunction remain poorly understood. Extrinsic factors can serve as environmental inflammatory triggers (inhaled irritants or particles, pneumoallergens, commensal and pathogenic bacteria), which induce epithelial damage (barrier dysfunction) and inflammatory mechanisms [1,5,28,42]. In a recent pathogenesis concept, CRSwNP is the result of a chronic nasal inflammatory response triggered by airway epithelial disruption regardless of the initial inductor of aggression [43]. This inductor, such as fungi, bacteria, or lipopolysaccharides (the main outer surface membrane component of Gram-negative bacteria), could increase IL-6 and OSM expression in nasal polyps [16,25]. Upregulation of IL-6 and OSM may also be explained by increased fibroblast activity dependent on ongoing chronic local inflammation possibly initiated by infection [11,25]. Restoring the integrity of the epithelial barrier after injury is also a key element in the defense capabilities of the respiratory epithelium.

TJs establish the polarity of the epithelial cell layer by forming a seal between adjacent epithelial cells, thereby separating the luminal compartment from the basolateral surface [5,8]. We showed that epithelial TJs, mainly represented by occludin and ZO-1, which are crucial proteins in producing the rate-limiting barrier to inhaled pathogens, are decreased in nasal polyps. OSM critically contributes to physiological and pathological processes, including extracellular matrix remodeling, differentiation, inflammatory response, proliferation, and drug resistance [44–46]. Therefore, a similar effect on HNECs could be expected, even though it has not been described thus far. The epithelial barrier is sensitive to inflammatory cytokines and surface antigens that alter the distribution of TJ proteins, thereby compromising epithelial barrier function [5]. Multiple chronic inflammatory disease states exhibit epithelial permeability and TJ defects (abnormalities of TJ structure and function), such as asthma and chronic bronchitis [11,47]. The results from experiments on HNECs published by Wise et al. in 2014 support the concept that the CRSwNP epithelium comprises a “leakier” barrier than control mucosae [37]. They also decreased the expression of TJ proteins *in vitro* in HNECs exposed to IL-4 and IL-13 [37]. These findings support the role of secreted cytokines in the perpetuation of increased epithelial permeability, as we reported with OSM. OSM, secreted following the stimulation of an inductor, amplifies the inflammatory response and is an important factor in the alteration of these TJs. When the HNECs were stimulated by OSM, we noted a decrease in the expression of TJs after treatment with 10 ng/mL OSM. We chose to study the effects of three increasing concentrations (1, 10, and 100 ng/mL) to analyze the dose–response based on our previous *in vitro* studies on skin epithelial cells [23], demonstrating a dose–response effect. The concentrations chosen are those most frequently used in the literature [11,48,49]. In this study, we did not observe any effect for OSM at 1 ng/mL and a response was observed at 10 ng/mL, similar to the one found at 100 ng/mL. These concentrations are similar to those found *in vivo*. Therefore, we selected 10 ng/mL as the working concentration. Regarding the expression in tissues, most studies have reported enhanced OSM mRNA, and several studies have evaluated the concentration of OSM secreted by T cells ranging from 0.5 to 10 ng/mL [24,50] demonstrating that the protein is present in the tissue [11,48,49]. In this study, OSM mRNA was enhanced in nasal polyps when compared to the control mucosa; the protein was not detected in the tissue but in the supernatants of the cultured polyps ( $192 \pm 75$  pg/mL), as expected for a secretory factor. The question of *in vivo* relevance is very important, in our study the concentrations chosen were slightly higher, but the response is complex, keeping in mind that cytokines have paracrine effects. In addition, OSM

was tested alone and a synergistic effect with other cytokines *in vivo* should be taken into account. These observations are concordant with those of Pothoven et al., who described an alteration of epithelial TJs with immunofluorescence analysis [11]. Unlike OSM, IL-6 had no effect on epithelial TJs or epithelial permeability. Although IL-6 plays an important role in the development and progression of inflammatory responses, autoimmune diseases, and cancers, as it can induce tissue damage, inflammation, and cell proliferation, IL-6 appears to only act on wound repair and ciliary function in CRSwNP [51,52]. If OSM and IL-6 belong to the same family of cytokines sharing the gp130 receptor, the IL-6 activities were mediated via gp130/gp130 dimerization of the transducing subunits whereas the OSM activities were mediated via gp130/OSMR or gp130/LIFR transducing subunits, recruiting specific downstream signals. This is the reason why, if IL-6 and OSM have closed biological effects, they also have specificities. We previously reported that OSM is clearly more potent and specific on epithelial cells than IL-6 [22], which could explain why OSM but not IL-6 affects the expression of proteins that constitute the TJ. The decrease in TEER in OSM-stimulated HNECs is in agreement with the results reported in normal bronchial epithelial cells by Pothoven et al. [26]. The TEER decrease in the control wells was likely due to manipulation of the ALI cell layer twice in 48 h by the placement of apical media for TEER measurement and subsequent removal of the apical media for continued incubation. The change in basal medium (DMEM-F12) instead of Pneumacult during 48 h to be free of growth factors could be another explanation.

Mucociliary dysfunction is a prominent pathophysiological feature of CRSwNP [53–56]. After the restoration of barrier integrity following epithelial wounding, mucociliary clearance represents a key step in the defense capacity of the airway epithelium and could be altered in CRSwNP. However, the precise mechanisms underlying mucociliary dysfunction are still unclear. A previous study demonstrated that IFN- $\gamma$  and IL-13 both significantly reduced ciliated cell differentiation and ciliary beating function in HNECs from CRSwNP patients [54]. In contrast, we previously reported that IL-6 increased ciliary beating functions and metachronal waves without modifying ciliary beating efficiency [28]. Ciliary function is a dynamic process that can be modified by exogen stimuli in physiological conditions [57]. OSM significantly reduced the mean ciliary efficiency index when compared with the unstimulated control, as reported for other proinflammatory cytokines (based on the percentage of ciliated cells and ciliary beat frequency), such as IFN- $\gamma$  and IL-13 [54]. Regarding the loss of function in HNECs, the ciliary beating index efficiency could be altered secondarily by increased epithelial permeability. If TJs are altered, epithelial barrier function is compromised, and ciliary function is impaired because of cell-to-cell adhesion rupture. The decrease in ciliary function therefore leads to the persistence of pathogens at the apical pole of epithelial cells and the maintenance of the inflammatory state. As OSM also alters TJs, the pathogens that are present can therefore penetrate the chorion and induce a greater inflammatory response. Another hypothesis is the effect of OSM on epithelial–mesenchymal transition (EMT), a crucial process that drives tumor metastasis [58]. OSM reportedly induces EMT and could have the same effect on HNECs. Moreover, *in vitro*, HNECs are assessed in an air–liquid interface, thus in a liquid medium. The effect of cytokines may be different *in vivo* from an *in situ* action in more solid tissue, therefore the dose–response effect transposition is not so evident. A smaller concentration could have a more important effect. To finish, cytokines diffuse in tissues to act in a paracrine way on their membrane receptors. This diffusion has been studied after skin injection of cytokines and could be facilitated on an epithelium whose permeability is increased [24,59]. Targeting OSM could therefore be a therapy of choice by restoring the epithelial barrier and increasing mucociliary clearance.

The repair of epithelial damage occurs in two basic steps. First, basal cells proliferate and migrate into the wound to cover the damaged area; thereafter, the progenitor cells stop proliferating and differentiate into ciliated or goblet cells. Epithelial TJs are then formed to reestablish barrier function in the repaired tissue [11]. Our results showed an alteration of epithelial barrier function under OSM stimulation as described previously by Wise under

IL-4 and IL-13 stimulation [37]. Once compromised, the epithelial barrier allows access to the subepithelial tissue, resulting in a chronic inflammatory response [37]. No investigation regarding the potential mechanisms for the accelerated wound repair rate in the OSM exposure group has been performed. Nevertheless, a correlation can be drawn between epithelial permeability and an increased wound repair rate. Indeed, in an IL4-cytokine exposure group from a sinonasal epithelial wound healing model described by Wise et al., the decreased wound repair rate was correlated with an alteration of TJ complex proteins such as annexin A2 [60]. In OSM-stimulated HNECs, the proliferation of epithelial cells is therefore associated with a defective epithelial barrier and an alteration of ciliary function.

In summary, a correlation between the increased wound repair rate and the decreased ciliary beating efficiency could be drawn at a cellular level, but we must note that the molecular basis involved in the process of ciliogenesis remains largely unknown. Laoukili et al. reported that IL-13 alters epithelial cell morphology and ciliated cell differentiation but increases the proportion of secretory cells [55]. Secretory cells and basal cells are involved in cell proliferation in wound healing models. Indeed, epithelial wound repair is characterized by basal cell spreading and migration, followed by proliferation and differentiation. These steps are part of an important process during which epithelial barrier integrity is rapidly restored after a breach. On the one hand, under OSM stimulation, the wound repair rate is increased, probably due to basal cell spreading and migration [61]. On the other hand, under OSM stimulation, the proportion of ciliated cells is reduced, similar to IL-13 stimulation, as reported by Laoukili et al. [55]. The effects reported in this study were enabled through type II OSM receptors, as they were the only OSM receptors identified in nasal polyps. Therefore, we can infer some of the signaling pathways involved with type II OSM receptors for which heterodimerization drives JAK recruitment even though no mechanistic studies have been performed [62]. The C-terminal region of receptor type II contains tyrosine residues, which, phosphorylated by JAK1/2, act as a docking site for STAT1 and STAT3. OSM can also activate other downstream proteins, such as ERK1/2, p38, JNK, the PI3K/Akt pathway, and PKC $\delta$ . It can also activate STAT6 in a cell-type-specific way [44,63].

In the present study, we confirmed our hypothesis that OSM alters airway epithelial repair mechanisms by an increased wound closure rate similar to the effect observed with IL-6 on HNECs in a previous study [28] or in other tissues, such as human skin [21–24]. Elevated OSM may be one signal that initiates a repair step following cellular damage. Studying the *in vitro* OSM effects on cell differentiation after wound closure could be of great interest. In addition to epithelial cell proliferation, does OSM allow the differentiation of progenitor cells to restore the previous epithelial functions or deleterious functions?

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Tissue, Cells Collection, and Primary Culture of HNEC

The nasal polyps and control mucosa were each obtained from nine patients. Small-sized control tissues were obtained from patients operated on for non-inflammatory and non-tumoral diseases of the paranasal sinuses (agreement of the French “Ministère de l’Enseignement supérieur et de la Recherche” (DC-20193746, December 2019)) and frozen in liquid nitrogen before protein extraction. To study OSM secretion by the polyps, the use of control mucosa from healthy patients should be morphologically calibrated on the polyps to be interpretable. During this experiment, the polyps were fragmented into 3 mm<sup>3</sup> pieces. It appears ethically impossible to take such fragments of mucosa from healthy patients who have not been operated on for CRSwNP or any other infectious and tumoral cause.

HNEC cultures were obtained from nasal polyps from 27 patients undergoing a surgical procedure for CRSwNP. All of the patients gave informed consent and the study was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01). All of the patients abstained from oral or topical corticosteroids for one month before the surgery. The tissues were immediately placed in a culture medium and transported to the laboratory for HNEC isolation and culture or frozen in liquid nitrogen before protein and nucleic acid extraction. The HNECs were isolated from nasal polyps as previously described by Coste et al. [12].

Briefly, the nasal polyps 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, USA) with 12 mm-diameter polycarbonate micropore membranes (pore size of 0.4  $\mu$ m) coated with type IV collagen (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) 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, Saint Egrève France, 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 had already been confirmed by flow cytometric analysis of cytokeratin immunofluorescent labeling showing 95% and 99% of positive cells on days 3 and 7, respectively [64]. The epithelial nature of the cultured cells has previously been well-demonstrated, leading to wide use of the primary culture of HNECs [12,28,41,65–71]. 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) [72].

#### 4.2. Tight Junctions Protein Expression (ZO-1 and Occludin) and IL-6 and OSM mRNA Expression in the Nasal Polyps and Control Mucosa

To evaluate IL-6 and OSM mRNA expression in the nasal polyps and control mucosa, total RNA from the nasal polyps and control mucosa was isolated using a NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and reverse-transcribed with SuperScript<sup>®</sup> II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed using a Light Cycler-FastStart DNA MasterPlus SYBR<sup>®</sup> Green I kit and a LightCycler 480 system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The reaction components consisted of 1x DNA Master Mix and 0.5  $\mu$ M sense and anti-sense oligonucleotides purchased from Eurogentec (Eurogentec France, Angers, France) and designed using Primer3 software. We quantified the expression of OSM (forward: ACTGAGTGCATGAAGCGATG; reverse: CATCGAGGACTTGGAGAA-GC) and IL-6 (forward: CATCCATCTTTTTCAGCCAT; reverse: ATGTAGCCGCCCCACACAGA). Relative RNA expression was determined according to the  $\Delta$ CT method (relative expression =  $2^{\exp(\Delta CT)}$  =  $2^{\exp(CT_{\text{target}} - CT_{\text{glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase}})}$ ) (GAPDH: forward: GGGTGTGCTGTTGAAGTCAGAGG; reverse: GGCTCTCCAGAA-CATCATCCCTGC).

To evaluate TJ proteins expression, the nasal polyps and control mucosa were lysed with 350  $\mu$ L of radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA), and protein concentrations were determined by BCP protein assay (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After separation on a 4–20% SDS-PAGE gel (NuSep, Germantown, Germany), the proteins were transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) by electroblotting. Immunodetection of occludin, ZO-1, and GAPDH was performed by co-incubation with a rabbit anti-occludin antibody (Ab) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a mouse anti-ZO-1 Ab (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a mouse anti-GAPDH mAb (Novus, clone 2D4A7), followed by co-incubation with anti-rabbit and anti-mouse IgG peroxidase-conjugated polyclonal Abs (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Peroxidase activity was detected by chemiluminescence (Luminata HRP substrate from Merck Millipore Burlington, MA, USA) and analyzed using a LAS-3000 imaging system. Signal intensity was measured using ImageJ software v1.53k. The ratios of occludin and ZO-1/GAPDH were calculated and are shown in the corresponding figures.

#### 4.3. OSM Secretion by ELISA

To assess the secretion of OSM by nasal polyps, we cultured 3 mm<sup>3</sup> fragments of polyps from patients with CRSwNP with a culture medium (Dulbecco's modified Eagle's

medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum (FCS), 10 µg/mL gentamycin, 10 µg/mL ceftazidime and 2.5 µg/mL amphotericin B (all from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

After 48 h, the supernatant was collected and centrifuged. The detection of OSM was conducted using sandwich ELISA (R&D system, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

#### 4.4. IL-6 and OSM Receptors RNA Expression in HNECs (RT-qPCR)

On day 21, total RNA from the HNECs was isolated using a NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and reverse-transcribed with SuperScript® II reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was performed using a LightCycler-FastStart DNA Master-Plus SYBR® Green I kit and a LightCycler 480 system (Roche Diagnostics, Meylan, France). The reaction components consisted of 1x DNA Master Mix and 0.5 µM sense and anti-sense oligonucleotides purchased from Eurogentec (Eurogentec France, Angers, France) and designed using Primer3 software. We quantified the expression of cytokine receptors (IL-6 receptor (IL-6R) (forward: GAGATTCTGCAAATGCGACA; reverse: GTGGGGAGATGAGGGAACA), OSMR (forward: GGAGACTGCCATTTGCATTT; reverse: GAGTTTGGCGAAAGTGTACAGCAG, LIFR (forward: GCCTGCATTTACAAGGTGGT; reverse: ACCAATGACTGGGCTTTCAC), and gp130 (forward: GGTGACCACTGGGCAATATGACTC; reverse: CGAATGGCAGCATAACAGATGAAG) in the HNECs. Relative RNA expression was determined according to the  $\Delta\Delta C_T$  method (relative expression =  $2^{\Delta\Delta C_T}$ ) =  $2^{\Delta C_T \text{ target} - \Delta C_T \text{ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase}}$ ) (GAPDH: forward: GGGT-GTCGCTGTTGAAGTCAGAGG; reverse: GGCTCTCCAGAACATCATCCCTGC).

#### 4.5. ZO-1 and Occludin Protein Expression in HNECs (Western blot) with or without IL-6 or OSM

To evaluate the mechanism of OSM and IL-6 on epithelial barrier function, we evaluated in vitro the expression level of occludin and ZO-1 at protein levels in cytokine-stimulated HNECs. 1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL were the concentrations chosen according to previous studies that showed an IL effect on epithelial cells [28,37,60,73] to identify a dose-response effect. After 48 h of stimulation, Western blot was performed as previously described. Immunodetection of occludin, ZO-1, and GAPDH was performed by co-incubation with a rabbit anti-occludin antibody (Ab) (Invitrogen, MA, USA), a mouse anti-ZO-1 Ab (Invitrogen, Waltham, MA, USA), and mouse anti-GAPDH mAb (Novus, clone 2D4A7), followed by co-incubation with an anti-rabbit and an anti-mouse IgG peroxidase-conjugated polyclonal Abs (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### 4.6. Actin and ZO-1 Protein Expression in HNECs (Immunolabelling) with or without IL-6 or OSM

After 48 h of incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in complete medium (control conditions) or complete medium supplemented with IL (either IL-6 or OSM at 1, 10, or 100 ng/mL final concentrations), once TEER measurements were performed, the cells were washed with PBS and then fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde. The first step of immunolabelling was to permeabilize the cells by the addition of 0.3% Triton in PBS Ca<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> (PBS+/+). Non-specific sites were blocked by incubation of PBS-1% BSA with normal goat serum (PBS-NSA-NGS 1%) for 30 min at room temperature (RT). The cells were thereafter incubated for 1 h at RT with rhodamine-phalloidin reagent (ab235138, Abcam) diluted at 1/2000 in PBS-NSA-NGS 1% for actin fibers (in green). After that, the cells were incubated with an Anti ZO-1 Polyclonal Antibody (Invitrogen) diluted at 1/1000 in PBS-BSA-NGS 1% for ZO-1 expression. ZO-1 was then detected with an Alexa-488 labeled secondary antibody (Life Technology, Carlsbad, California, United States of America, ref. A-21042 diluted 1/1000 in PBS-BSA-NGS 1%). After rinsing with PBS, coverslips were mounted on a slide with the cell side up in ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (ref P36935, ThermoFisher Scientific). Stained structures were observed, and images were acquired on

an Axio Imager confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Bade-Wurtemberg, Germany) at  $63\times$  magnification. As we used the same parameters (labeling intensity and magnifications) for all conditions, qualitative analysis was performed in between conditions.

#### 4.7. TEER in HNECs (EVOM) with or without IL-6 or OSM

TEER provides a physical measure of the electrical resistance across the epithelial cell barrier, widely used as an indicator of in vitro permeability [74]. TEER was measured using an epithelial volt-ohm meter (EVOM) with an ENDOHM-12 electrode (World Precision Instruments, New Haven, CT, USA). The values for cell-covered filters were expressed in standard units of ohms per square centimeter ( $\Omega/\text{cm}^2$ ) after subtracting the resistance of blank filters and are presented as the mean  $\pm$  standard error. TEER measurements were used before each experiment to assess cellular viability [75] and only HNECs with a TEER  $> 200 \Omega/\text{cm}^2$  were used. To evaluate the effect of cytokines on epithelial barrier function, epithelial permeability was determined by measuring TEER in both stimulated and unstimulated HNECs before and after 48 h in various concentrations (1 ng/mL; 10 ng/mL and 100 ng/mL). Cells treated with a medium alone served as a control.

#### 4.8. Wound Repair Rate in HNECs (Time-Lapse Images) with or without OSM

The in vitro wound repair assay was carried out according to a model of mechanical injury adapted from a previously described method performed on fully differentiated cultures of HNECs [76]. We created a controlled linear wound of 12 mm length  $\times$  1.4 mm by scraping the HNECs with a pipette tip, followed by extensive washing to remove cellular debris (three times with PBS+/+). To determine the repair rate, time-lapse images were taken at regular intervals with an inverted microscope (Zeiss, Axiovert200M, France) equipped with an  $\times 10$  objective over a period of 48 h, depending on the time of wound closure (H18, H24, H42, and H48 after wound healing). The wound areas were then quantified by image analysis software (Image J, v1.53k). Wound closure was evaluated as 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 concentration tested. Wound closure in the presence of exogenous OSM was compared to the unstimulated control in the context of the serum-free and cytokine-free medium. Immediately after wounding, the HNECs were exposed to DMEM-HAM-F12-Penicillin–Streptomycin–Fungizone–Gentamycin–free medium with or without OSM at various concentrations (1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL). Each OSM concentration was tested in duplicate for each culture from the same patient.

#### 4.9. Ciliary Beating Efficiency in HNECs (High-Speed Videomicroscopy) with or without OSM

All analyses were performed at controlled RT (20–25 °C). We used an inverted microscope in brightfield conditions associated with a  $\times 40$  objective. Approximately 30  $\mu\text{L}$  of 4.5  $\mu\text{m}$  polystyrene microbeads 0.125% *w/v* was added to 70  $\mu\text{L}$  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, ON, Canada) at a rate of 358 frames per second. Each movie was composed of 1800 frames with a definition of  $256 \times 192$  pixels, with each individual pixel being  $(0.32 \times 0.32) \mu\text{m}^2$  with a  $\times 40$  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 efficiency index, a very specific parameter in CRSwNP [77,78], was recorded and analyzed in the ciliated edges of different conditions. Each condition was analyzed in duplicate or triplicate for each condition. The  $\times 40$  objective was used for all analyses. All of the parameters were studied using the analysis software that we had developed from the Matlab platform (Stream2D). 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)), as previously reported [77,78].

#### 4.10. Statistical Analysis

Statistics were performed with R software (v. 4.1.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, [www.r-project.org](http://www.r-project.org), accessed on 1 October 2022). Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Comparisons of TJs expression, TEER, ciliary beating, and repair rate between the cytokine-stimulated conditions and the unstimulated controls were performed with a Wilcoxon test (unpaired data and quantitative variables). A  $p$ -value  $\leq 0.05$  was considered as significant.

#### 5. Conclusions

In summary, we have shown that in vitro, OSM, at concentrations close to those measured in vivo, decreased epithelial barrier function through a decrease in epithelial TJ expression, TEER, and ciliary beating efficiency but with an increased wound repair rate. We posit that OSM dysregulates epithelial barrier function through excessive epithelial wound closure and the loss of ciliary function, leading to a chronic inflammatory state that can evolve toward fibrosis.

Our data suggest that therapeutic inhibition of OSM and its downstream signaling may be advantageous in the treatment of mucosal diseases associated with type 2 inflammation and the loss of barrier function by potentially restoring the barrier function of mucosal epithelial cells.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24076094/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.B., L.F., M.F., S.T., A.C., J.C.L. and F.C.; data curation, M.F. and F.C.; formal analysis, E.B., M.F., L.F., S.B., X.D., M.B., B.L. and F.C.; methodology, E.B., M.F. and F.C.; project administration, A.C., B.L. and L.F.; resources, B.L. and L.F.; software, M.F. and B.L.; supervision, B.L., L.F., E.B., S.T., X.D., J.C.L. and A.C.; validation, E.B. and L.F.; visualization, A.C., X.D. and S.T.; writing—original draft, M.F., F.C., E.B., J.C.L. and L.F.; writing—review and editing, E.B., L.F., A.C., J.C.L., M.F., S.T., X.D., M.B. and F.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was approved by the Institutional Ethics Committee on Human Experimentation of the University Hospital of Poitiers and received the agreement of the French “Ministère de l’Enseignement supérieur et de la Recherche” (DC-20193746, December 2019). Regarding the primary culture of human nasal epithelial cells, all patients gave their informed consent and the study was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data supporting the reported results can be found in the Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), UR15560, Université de Poitiers, 86000 Poitiers and in the Laboratoire de l’Institut Mondor de Recherche Biomédical, INSERM U955, CNRS EMR 7000, 93000 Créteil.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Fokkens, W.J.; Lund, V.J.; Hopkins, C.; Hellings, P.W.; Kern, R.; Reitsma, S.; Toppila-Salmi, S.; Bernal-Sprekelsen, M.; Mullol, J.; Alobid, I.; et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology* **2020**, *58*, 1–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hastan, D.; Fokkens, W.J.; Bachert, C.; Newson, R.B.; Bislimovska, J.; Bockelbrink, A.; Bousquet, P.J.; Brozek, G.; Bruno, A.; Dahlén, S.E.; et al. Chronic Rhinosinusitis in Europe—an Underestimated Disease. A GA<sup>2</sup>LEN Study. *Allergy* **2011**, *66*, 1216–1223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tomassen, P.; Vandeplass, G.; van Zele, T.; Cardell, L.-O.; Arebro, J.; Olze, H.; Förster-Ruhrmann, U.; Kowalski, M.L.; Olszewska-Ziaber, A.; Holtappels, G.; et al. Inflammatory Endotypes of Chronic Rhinosinusitis Based on Cluster Analysis of Biomarkers. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2016**, *137*, 1449–1456.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Laidlaw, T.M.; Mullol, J.; Woessner, K.M.; Amin, N.; Mannent, L.P. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2021**, *9*, 1133–1141. [[CrossRef](#)]
5. Soyka, M.B.; Wawrzyniak, P.; Eiwegger, T.; Holzmann, D.; Treis, A.; Wanke, K.; Kast, J.I.; Akdis, C.A. Defective Epithelial Barrier in Chronic Rhinosinusitis: The Regulation of Tight Junctions by IFN- $\gamma$  and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *130*, 1087–1096.e10. [[CrossRef](#)]
6. Steelant, B.; Seys, S.F.; Boeckstaens, G.; Akdis, C.A.; Ceuppens, J.L.; Hellings, P.W. Restoring Airway Epithelial Barrier Dysfunction: A New Therapeutic Challenge in Allergic Airway Disease. *Rhinology* **2016**, *54*, 195–205. [[CrossRef](#)]
7. Georas, S.N.; Rezaee, F. Epithelial Barrier Function: At the Front Line of Asthma Immunology and Allergic Airway Inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 509–520. [[CrossRef](#)]
8. Chiba, H.; Osanai, M.; Murata, M.; Kojima, T.; Sawada, N. Transmembrane Proteins of Tight Junctions. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 588–600. [[CrossRef](#)]
9. Wladislavosky-Waserman, P.; Kern, E.B.; Holley, K.E.; Eisenbrey, A.B.; Gleich, G.J. Epithelial Damage in Nasal Polyps. *Clin. Allergy* **1984**, *14*, 241–247. [[CrossRef](#)]
10. Coste, A.; Wang, Q.P.; Roudot-Thoraval, F.; Chapelin, C.; Bedbeder, P.; Poron, F.; Peynègre, R.; Escudier, E. Epithelial Cell Proliferation in Nasal Polyps Could Be Up-Regulated by Platelet-Derived Growth Factor. *Laryngoscope* **1996**, *106*, 578–583. [[CrossRef](#)]
11. Pothoven, K.L.; Norton, J.E.; Hulse, K.E.; Suh, L.A.; Carter, R.G.; Rocci, E.; Harris, K.E.; Shintani-Smith, S.; Conley, D.B.; Chandra, R.K.; 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*, 737–746.e4. [[CrossRef](#)]
12. Coste, A.; Brugel, L.; Maître, B.; Boussat, S.; Papon, J.F.; Wingerstmann, L.; Peynègre, 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. [[CrossRef](#)]
13. Pawankar, R. Nasal Polyposis: An Update: Editorial Review. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *3*, 1–6. [[CrossRef](#)]
14. Bartier, S.; Coste, A.; Béquignon, E. Biotherapy and Treatment of Adult Primary Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Cellular and Molecular Bases. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* **2020**, *138*, 355–362. [[CrossRef](#)]
15. Pistochini, A.; Rossi, F.; Gallo, S.; Pirrone, C.; Preti, A.; Gornati, R.; Bernardini, G.; Castelnovo, P. Multiple Gene Expression Profiling Suggests Epithelial Dysfunction in Polypoid Chronic Rhinosinusitis. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* **2019**, *39*, 169–177. [[CrossRef](#)]
16. Carsuzaa, F.; Béquignon, É.; Dufour, X.; de Bonnezeze, G.; Lecron, J.-C.; Favot, L. Cytokine Signature and Involvement in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *23*, 417. [[CrossRef](#)]
17. Hirano, T. Interleukin 6 and Its Receptor: Ten Years Later. *Int. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 249–284. [[CrossRef](#)]
18. Rose-John, S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **2018**, *10*, a028415. [[CrossRef](#)]
19. Botelho, F.; Dubey, A.; Ayaub, E.A.; Park, R.; Yip, A.; Humbles, A.; Kolbeck, R.; Richards, C.D. IL-33 Mediates Lung Inflammation by the IL-6-Type Cytokine Oncostatin M. *Mediat. Inflamm.* **2020**, *2020*, 4087315. [[CrossRef](#)]
20. Matsuda, M.; Tsurusaki, S.; Miyata, N.; Saijou, E.; Okochi, H.; Miyajima, A.; Tanaka, M. Oncostatin M Causes Liver Fibrosis by Regulating Cooperation between Hepatic Stellate Cells and Macrophages in Mice. *Hepatology* **2018**, *67*, 296–312. [[CrossRef](#)]
21. Rabeony, H.; Petit-Paris, I.; Garnier, J.; Barrault, C.; Pedretti, N.; Guilloteau, K.; Jegou, J.-F.; Guillet, G.; Huguier, V.; Lecron, J.-C.; et al. Inhibition of Keratinocyte Differentiation by the Synergistic Effect of IL-17A, IL-22, IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  and Oncostatin M. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Guilloteau, K.; Paris, I.; Pedretti, N.; Boniface, K.; Juchaux, F.; Huguier, V.; Guillet, G.; Bernard, F.-X.; Lecron, J.-C.; Morel, F. Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1{alpha}, and TNF-{alpha} Recapitulates Some Features of Psoriasis. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 5263–5270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Boniface, K.; Diveu, C.; Morel, F.; Pedretti, N.; Froger, J.; Ravon, E.; Garcia, M.; Venereau, E.; Preisser, L.; Guignouard, E.; et al. Oncostatin M Secreted by Skin Infiltrating T Lymphocytes Is a Potent Keratinocyte Activator Involved in Skin Inflammation. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 4615–4622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Giot, J.-P.; Paris, I.; Levillain, P.; Huguier, V.; Charreau, S.; Delwail, A.; Garcia, M.; Garnier, J.; Bernard, F.-X.; Dagregorio, G.; et al. Involvement of IL-1 and Oncostatin M in Acanthosis Associated with Hypertensive Leg Ulcer. *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 806–818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Carsuzaa, F.; Béquignon, É.; Binaud, M.; Jégou, J.-F.; Dufour, X.; Lecron, J.-C.; Favot, L. Oncostatin M Counteracts the Fibrotic Effects of TGF-B1 and IL-4 on Nasal-Polyp-Derived Fibroblasts: A Control of Fibrosis in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rose-John, S. Interleukin-6 Signalling in Health and Disease. *F1000Res* **2020**, *9*, F1000 Faculty Rev-1013. [[CrossRef](#)]
27. Danielsen, A.; Tynning, T.; Brokstad, K.A.; 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*, 282–289. [[CrossRef](#)]
28. Béquignon, E.; Mangin, D.; Bécaud, J.; Pasquier, J.; Angely, C.; Bottier, M.; Escudier, E.; Isabey, D.; Filoche, M.; Louis, B.; et al. Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Role of IL-6 in Airway Epithelial Cell Dysfunction. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 136. [[CrossRef](#)]
29. Gubernatorova, E.O.; Gorshkova, E.A.; Namakanova, O.A.; Zvartsev, R.V.; Hidalgo, J.; Drutskaya, M.S.; Tumanov, A.V.; Nedospasov, S.A. Non-Redundant Functions of IL-6 Produced by Macrophages and Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2718. [[CrossRef](#)]

30. Gevaert, P.; Omachi, T.A.; Corren, J.; Mullol, J.; Han, J.; Lee, S.E.; Kaufman, D.; Ligueros-Saylan, M.; Howard, M.; Zhu, R.; et al. Efficacy and Safety of Omalizumab in Nasal Polyposis: 2 Randomized Phase 3 Trials. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, *146*, 595–605. [[CrossRef](#)]
31. Han, J.K.; Bachert, C.; Fokkens, W.; Desrosiers, M.; Wagenmann, M.; Lee, S.E.; Smith, S.G.; Martin, N.; Mayer, B.; Yancey, S.W.; et al. Mepolizumab for Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps (SYNAPSE): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet Respir. Med.* **2021**, *9*, 1141–1153. [[CrossRef](#)]
32. Bachert, C.; Mannent, L.; Naclerio, R.M.; Mullol, J.; Ferguson, B.J.; Gevaert, P.; Hellings, P.; Jiao, L.; Wang, L.; Evans, R.R.; et al. Effect of Subcutaneous Dupilumab on Nasal Polyp Burden in Patients with Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2016**, *315*, 469–479. [[CrossRef](#)]
33. Patel, G.B.; Kern, R.C.; Bernstein, J.A.; Hae-Sim, P.; Peters, A.T. Current and Future Treatments of Rhinitis and Sinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2020**, *8*, 1522–1531. [[CrossRef](#)]
34. Kim, D.W.; Cho, S.H. Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis and Its Application to Precision Medicine. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **2017**, *9*, 299–306. [[CrossRef](#)]
35. Cardell, L.-O.; Stjärne, P.; Jonstam, K.; Bachert, C. Endotypes of Chronic Rhinosinusitis: Impact on Management. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2020**, *145*, 752–756. [[CrossRef](#)]
36. Ren, L.; Zhang, N.; Zhang, L.; Bachert, C. Biologics for the Treatment of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps—State of the Art. *World Allergy Organ. J.* **2019**, *12*, 100050. [[CrossRef](#)]
37. Wise, S.K.; Laury, A.M.; Katz, E.H.; Den Beste, K.A.; Parkos, C.A.; Nusrat, A. Interleukin-4 and Interleukin-13 Compromise the Sinonasal Epithelial Barrier and Perturb Intercellular Junction Protein Expression. *Int. Forum. Allergy Rhinol.* **2014**, *4*, 361–370. [[CrossRef](#)]
38. Babbin, B.A.; Parkos, C.A.; Mandell, K.J.; Winfree, L.M.; Laur, O.; Ivanov, A.I.; Nusrat, A. Annexin 2 Regulates Intestinal Epithelial Cell Spreading and Wound Closure through Rho-Related Signaling. *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 951–966. [[CrossRef](#)]
39. Kirshner, J.; Schumann, D.; Shively, J.E. CEACAM1, a Cell-Cell Adhesion Molecule, Directly Associates with Annexin II in a Three-Dimensional Model of Mammary Morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50338–50345. [[CrossRef](#)]
40. Hopkins, A.M.; Bruewer, M.; Brown, G.T.; Pineda, A.A.; Ha, J.J.; Winfree, L.M.; Walsh, S.V.; Babbin, B.A.; Nusrat, A. Epithelial Cell Spreading Induced by Hepatocyte Growth Factor Influences Paxillin Protein Synthesis and Posttranslational Modification. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2004**, *287*, G886–G898. [[CrossRef](#)]
41. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Van Zele, T.; Gevaert, P.; Watelet, J.-B.; Claeys, G.; Holtappels, G.; Claeys, C.; van Cauwenberge, P.; Bachert, C. Staphylococcus Aureus Colonization and IgE Antibody Formation to Enterotoxins Is Increased in Nasal Polyposis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *114*, 981–983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kariyawasam, H.H. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Insights into Mechanisms of Disease from Emerging Biological Therapies. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2019**, *15*, 59–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Masjedi, A.; Hajizadeh, F.; Beigi Dargani, F.; Beyzai, B.; Aksoun, M.; Hojjat-Farsangi, M.; Zekiy, A.; Jadidi-Niaragh, F. Oncostatin M: A Mysterious Cytokine in Cancers. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *90*, 107158. [[CrossRef](#)]
45. Tanaka, M.; Miyajima, A. Oncostatin M, a Multifunctional Cytokine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2003**, *149*, 39–52.
46. Stephens, J.M.; Elks, C.M. Oncostatin M: Potential Implications for Malignancy and Metabolism. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 3645–3657. [[CrossRef](#)]
47. Elia, C.; Bucca, C.; Rolla, G.; Scappaticci, E.; Cantino, D. A Freeze-Fracture Study of Human Bronchial Epithelium in Normal, Bronchitic and Asthmatic Subjects. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **1988**, *20*, 509–517.
48. Beigel, F.; Friedrich, M.; Probst, C.; Sotlar, K.; Göke, B.; Diegelmann, J.; Brand, S. Oncostatin M Mediates STAT3-Dependent Intestinal Epithelial Restitution via Increased Cell Proliferation, Decreased Apoptosis and Upregulation of SERPIN Family Members. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93498. [[CrossRef](#)]
49. Bernard, C.; Merval, R.; Lebret, M.; Delerive, P.; Dusanter-Fourt, I.; Lehoux, S.; Créminon, C.; Staels, B.; Maclouf, J.; Tedgui, A. Oncostatin M Induces Interleukin-6 and Cyclooxygenase-2 Expression in Human Vascular Smooth Muscle Cells: Synergy with Interleukin-1beta. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 1124–1131. [[CrossRef](#)]
50. Gurluler, E.; Tumay, L.V.; Guner, O.S.; Kucukmetin, N.T.; Hizli, B.; Zorluoglu, A. Oncostatin-M as a Novel Biomarker in Colon Cancer Patients and Its Association with Clinicopathologic Variables. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2014**, *18*, 2042–2047.
51. Scheller, J.; Ohnesorge, N.; Rose-John, S. Interleukin-6 Trans-Signalling in Chronic Inflammation and Cancer. *Scand. J. Immunol.* **2006**, *63*, 321–329. [[CrossRef](#)]
52. 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.* **2012**, *122*, 143–159. [[CrossRef](#)]
53. Wynne, M.; Atkinson, C.; Schlosser, R.J.; Mulligan, J.K. Contribution of Epithelial Cell Dysfunction to the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2019**, *33*, 782–790. [[CrossRef](#)]
54. 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. [[CrossRef](#)]
55. Laoukili, J.; Perret, E.; Willems, T.; Minty, A.; Parthoens, E.; Houcine, O.; Coste, A.; Jorissen, M.; Marano, F.; Caput, D.; et al. IL-13 Alters Mucociliary Differentiation and Ciliary Beating of Human Respiratory Epithelial Cells. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 1817–1824. [[CrossRef](#)]

56. Grosse-Onnebrink, J.; Werner, C.; Loges, N.T.; Hörmann, K.; Blum, A.; Schmidt, R.; Olbrich, H.; Omran, H. Effect of TH2 Cytokines and Interferon Gamma on Beat Frequency of Human Respiratory Cilia. *Pediatr. Res.* **2016**, *79*, 731–735. [[CrossRef](#)]
57. Wanner, A. Clinical Perspectives: Role of the Airway Circulation in Drug Therapy. *J. Aerosol. Med.* **1996**, *9*, 19–23. [[CrossRef](#)]
58. Liu, Y.-C.; Yeh, C.-T.; Lin, K.-H. Cancer Stem Cell Functions in Hepatocellular Carcinoma and Comprehensive Therapeutic Strategies. *Cells* **2020**, *9*, 1331. [[CrossRef](#)]
59. Lecron, J.-C.; Charreau, S.; Jégou, J.-F.; Salhi, N.; Petit-Paris, I.; Guignouard, E.; Burucoa, C.; Favot-Laforge, L.; Bodet, C.; Barra, A.; et al. IL-17 and IL-22 Are Pivotal Cytokines to Delay Wound Healing of *S. Aureus* and *P. Aeruginosa* Infected Skin. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 984016. [[CrossRef](#)]
60. Wise, S.K.; Den Beste, K.A.; Hoddeson, E.K.; Parkos, C.A.; 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*, 439–449. [[CrossRef](#)]
61. Lee, S.-N.; Ahn, J.-S.; Lee, S.G.; Lee, H.-S.; Choi, A.M.K.; Yoon, J.-H. Integrins Av $\beta$ 5 and Av $\beta$ 6 Mediate IL-4-Induced Collective Migration in Human Airway Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, *60*, 420–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Caligiuri, A.; Gitto, S.; Lori, G.; Marra, F.; Parola, M.; Cannito, S.; Gentilini, A. Oncostatin M: From Intracellular Signaling to Therapeutic Targets in Liver Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 4211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Fritz, D.K.; Kerr, C.; Tong, L.; Smyth, D.; Richards, C.D. Oncostatin-M up-Regulates VCAM-1 and Synergizes with IL-4 in Eotaxin Expression: Involvement of STAT6. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 4352–4360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Papon, J.-F.; Coste, A.; Gendron, M.-C.; Cordonnier, C.; Wingerstmann, L.; Peynègre, R.; Escudier, E. HLA-DR and ICAM-1 Expression and Modulation in Epithelial Cells from Nasal Polyps. *Laryngoscope* **2002**, *112*, 2067–2075. [[CrossRef](#)]
65. 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. [[CrossRef](#)]
66. Ramanathan, M.; 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. [[CrossRef](#)]
67. Bequignon, E.; Dhommée, C.; Angely, C.; Thomas, L.; Bottier, M.; Escudier, E.; Isabey, D.; Coste, A.; Louis, B.; Papon, J.-F.; et al. FcRn-Dependent Transcytosis of Monoclonal Antibody in Human Nasal Epithelial Cells In Vitro: A Prerequisite for a New Delivery Route for Therapy? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1379. [[CrossRef](#)]
68. Jeanson, L.; Guerrero, I.C.; Papon, J.-F.; Chhuon, C.; Zadigue, P.; Prulière-Escabasse, V.; Amselem, S.; Escudier, E.; Coste, A.; Edelman, A. Proteomic Analysis of Nasal Epithelial Cells from Cystic Fibrosis Patients. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108671. [[CrossRef](#)]
69. Botterel, F.; Gross, K.; Ibrahim-Granet, O.; Khoufache, K.; Escabasse, V.; Coste, A.; Cordonnier, C.; Escudier, E.; Bretagne, S. Phagocytosis of *Aspergillus Fumigatus* Conidia by Primary Nasal Epithelial Cells in Vitro. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 97. [[CrossRef](#)]
70. 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.
71. Khoufache, K.; Puel, O.; Loiseau, N.; Delaforge, M.; Rivollet, D.; Coste, A.; Cordonnier, C.; Escudier, E.; Botterel, F.; Bretagne, S. Verruculogen Associated with *Aspergillus Fumigatus* Hyphae and Conidia Modifies the Electrophysiological Properties of Human Nasal Epithelial Cells. *BMC Microbiol.* **2007**, *7*, 5. [[CrossRef](#)]
72. Cao, H.; Ouyang, H.; Grasmann, 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. [[CrossRef](#)]
73. Cho, S.H.; Kim, D.W.; Lee, S.H.; Kolliputi, N.; Hong, S.J.; Suh, L.; Norton, J.; Hulse, K.E.; Seshadri, S.; Conley, D.B.; 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*, 601–606. [[CrossRef](#)]
74. Klingberg, T.D.; Pedersen, M.H.; Cencic, A.; Budde, B.B. Application of Measurements of Transepithelial Electrical Resistance of Intestinal Epithelial Cell Monolayers to Evaluate Probiotic Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7528–7530. [[CrossRef](#)]
75. Yeo, N.-K.; Jang, Y.J. Rhinovirus Infection-Induced Alteration of Tight Junction and Adherens Junction Components in Human Nasal Epithelial Cells. *Laryngoscope* **2010**, *120*, 346–352. [[CrossRef](#)]
76. Lechapt-Zalcman, E.; Prulière-Escabasse, V.; Advenier, D.; Galiacy, S.; Charrière-Bertrand, C.; Coste, A.; Harf, A.; D’Ortho, M.-P.; Escudier, E. 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*, L1277–L1282. [[CrossRef](#)]
77. Bottier, M.; Blanchon, S.; Pelle, G.; Bequignon, E.; Isabey, D.; Coste, A.; Escudier, E.; Grotberg, J.B.; Papon, J.-F.; Filoche, M.; 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*, e1005605. [[CrossRef](#)]
78. Bottier, M.; Peña Fernández, M.; Pelle, G.; Isabey, D.; Louis, B.; Grotberg, J.B.; Filoche, M. A New Index for Characterizing Micro-Bead Motion in a Flow Induced by Ciliary Beating: Part II, Modeling. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005552. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 7. Article IL-4, IL-13 & Dupilumab

Cette étude a été soumise pour publication au *JACI* (IF=14, rang A) et a été acceptée en tant que communication orale pour le congrès européen de l'ERS à Sofia en juin 2023 et également au congrès national de la SFORL & CCF en octobre 2023.

### Résumé Français de l'article

La polypose nasosinusienne (PNS) est une maladie inflammatoire de type 2, impliquant plusieurs cytokines, dont l'IL-4 et l'IL-13, et associée à un dysfonctionnement des cellules épithéliales. Le dupilumab est un anticorps monoclonal entièrement humain qui cible l'IL-4R $\alpha$ , le récepteur commun de l'IL-4 et de l'IL-13, bloquant ainsi la signalisation de ces deux cytokines. Cette étude vise à évaluer l'effet direct *in vitro* du dupilumab sur la barrière épithéliale nasale. Des cultures primaires de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) provenant de 35 patients atteints de PNS ont été utilisées pour étudier l'effet *in vitro* de l'IL-4, de l'IL-13 (1, 10 et 100 ng/ml) et du dupilumab sur la résistance électrique transépithéliale (RETE), l'expression des protéines de jonction serrées (JS), l'efficacité du battement ciliaire et la vitesse de réparation épithéliale après blessures. L'IL-4 (1 ng/ml), mais pas l'IL-13, a induit une diminution significative de la RETE, qui a été restaurée par le dupilumab et l'anti IL-6. L'IL-4 (1, 10 et 100 ng/ml) mais pas l'IL-13 a induit une diminution significative de l'expression des protéines de JS (occludine et ZO-1), de l'efficacité du battement ciliaire et de la vitesse de réparation épithéliale après blessures *in vitro* dans les CENH. Le dupilumab n'a eu aucun effet direct sur les CENH et a restauré toutes les fonctions épithéliales altérées lorsque les cellules étaient exposées à un environnement inflammatoire, caractérisé ici par l'exposition à l'IL-4. Ces résultats suggèrent que le dupilumab, en contrant les effets de l'IL-4, restaure les fonctions des cellules épithéliales telles que l'intégrité de la barrière, la clairance mucociliaire et la vitesse de réparation épithéliale après blessures. Ces résultats contribuent à la compréhension de son efficacité *in vivo* et soutiennent l'hypothèse d'une dysrégulation épithéliale dans la pathogénie de la PNS.

# The Journal of Allergy and Clinical Immunology

## Dupilumab restores nasal epithelial barrier functions altered by IL-4 in vitro: additional proof for its efficacy

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Section/Category:</b>	Rhinitis, sinusitis, and ocular allergy
<b>Keywords:</b>	CRSwNP; nasal polyposis; nasal epithelium; IL-4; IL-13; Dupilumab; ciliary beating efficiency; epithelial electrical resistance; tight junctions; repair rate; primary culture; epithelial barrier
<b>Corresponding Author:</b>	Maxime Fieux, M.D. Pierre Bénite, FRANCE
<b>First Author:</b>	Maxime Fieux, M.D.
<b>Order of Authors:</b>	Maxime Fieux, M.D. Florent Carsuzaa, MD Bellanger Yvan, MD Sophie Bartier, MD Virginie Fournier Jean Claude Lecron, PhD Matthieu Binaud, MD Bruno Louis, PhD Stéphane Tringali, MD, PhD Xavier Dufour, MD, PhD André Coste, MD, PhD Laure Favot, PhD Emilie Bequignon, MD, PhD
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	FRANCE
<b>Abstract:</b>	<p>Background: Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a typical type 2 inflammation involving IL-4 and IL-13. Dupilumab is a fully human monoclonal antibody targeting IL-4R<math>\alpha</math>, the shared receptor component for IL-4 and IL-13, thereby blocking signaling by both cytokines. This study, aimed to evaluate the in vitro direct effect of Dupilumab on nasal epithelial barrier.</p> <p>Methods: Air-liquid interface (ALI) primary cultures of human nasal epithelial cells (HNEC) from 35 patients with CRSwNP were used to investigate the in vitro effect of IL-4, IL-13 (1, 10, and, 100 ng/ml) and Dupilumab on transepithelial electrical resistance (TEER), tight junction (TJ) protein expression, ciliary beating efficiency, and wound repair rate.</p> <p>Results: IL-4 (1 ng/ml) but not IL-13 induced a significant decrease in TEER, which was counteracted by biologics. IL-4 (1, 10 and 100ng/ml) but not IL-13 induced a significant decrease in occludin and ZO-1 protein expression, ciliary beating efficiency, and wound repair rate in HNEC. Dupilumab had no effect on HNEC and specifically restored all epithelial functions altered when cells were exposed to an inflammatory environment, herein characterized by IL-4 exposure.</p> <p>Conclusion: These results suggest that Dupilumab, by counteracting the effects of IL-4, restores epithelial cell functions such as barrier integrity, ciliary clearance, and wound repair rate. These results contribute to the understanding of its in vivo efficacy and support the epithelial dysregulation hypothesis in CRSwNP pathogenesis.</p>

1 **Title: Dupilumab restores nasal epithelial barrier functions altered by IL-4 *in vitro*: additional**  
2 **proof for its efficacy**

3  
4 **Authors:** Maxime Fieux, MD<sup>1,2,3,4,\*</sup>; Florent Carsuzaa, MD<sup>5,6</sup>; Yvan, Bellanger, MD<sup>3,4,7</sup>; Sophie Bartier,  
5 MD<sup>3,4,7,8</sup>; Virginie Fournier<sup>3,4</sup>; Jean Claude Lecron, PhD<sup>5,9</sup>; Matthieu Binaud, MD<sup>5,9</sup>; Bruno Louis,  
6 PhD<sup>3,4</sup>; Stéphane Tringali, MD-PhD<sup>1,2,10</sup>; Xavier Dufour, MD-PhD<sup>5,6</sup>; André Coste, MD-PhD<sup>3,4,7</sup>; Laure  
7 Favot, PhD<sup>5</sup>; Emilie Bequignon, MD-PhD<sup>3,4,7</sup>

8  
9 <sup>1</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Service d'ORL, d'Otoneurochirurgie et de  
10 Chirurgie Cervico-Faciale, F-69310 Pierre Bénite, France

11 <sup>2</sup> Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud-Charles Mérieux, Université de Lyon, Université  
12 Lyon 1, F-69003 Lyon, France

13 <sup>3</sup> CNRS EMR 7000, F-94010 Créteil, France

14 <sup>4</sup> INSERM, IMRB, Univ Paris Est Créteil, F-94010 Créteil, France

15 <sup>5</sup> Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), UR15560, Université de Poitiers,  
16 F-86000 Poitiers, France

17 <sup>6</sup> Service ORL, Chirurgie Cervico-Maxillo-Faciale et Audiophonologie, Centre Hospitalier  
18 Universitaire de Poitiers, F-86000 Poitiers, France

19 <sup>7</sup> Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie  
20 Cervico-Faciale, F-94010 Créteil, France

21 <sup>8</sup> Service d'ORL, de Chirurgie Cervico Faciale, Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique des  
22 Hôpitaux de Paris, F-94010 Créteil, France

23 <sup>9</sup> Service Immunologie et Inflammation, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, F-86021 Poitiers,  
24 France

25 <sup>10</sup> UMR 5305, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Institut de Biologie et  
26 Chimie des Protéines, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, 7 Passage du Vercors, CEDEX 07, F-  
27 69367 Lyon, France

28 \* Correspondence: maxime.fieux@chu-lyon.fr; Hospices Civils Lyon, Hôpital Lyon Sud, 165 Chemin  
29 du Grand Revoyet, 69310 Pierre-Bénite, France; Tel.: +33-4-72-66-64-15 ; Fax +33 4 78 86 33 36

30  
31 **Conflict of interest :** MF, EB, FC, XD, and AC have received honoraria from Sanofi and GlaxoSmith.  
32 All other authors have no competing interests in relation to this work.

33 **Abstract**

34 **Background:** Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a typical type 2 inflammation  
35 involving IL-4 and IL-13. Dupilumab is a fully human monoclonal antibody targeting IL- 4R $\alpha$ , the  
36 shared receptor component for IL- 4 and IL- 13, thereby blocking signaling by both cytokines. This  
37 study, aimed to evaluate the *in vitro* direct effect of Dupilumab on nasal epithelial barrier.

38 **Methods:** Air-liquid interface (ALI) primary cultures of human nasal epithelial cells (HNEC) from 35  
39 patients with CRSwNP were used to investigate the *in vitro* effect of IL-4, IL-13 (1, 10, and, 100 ng/ml)  
40 and Dupilumab on transepithelial electrical resistance (TEER), tight junction (TJ) protein expression,  
41 ciliary beating efficiency, and wound repair rate.

42 **Results:** IL-4 (1 ng/ml) but not IL-13 induced a significant decrease in TEER, which was counteracted  
43 by biologics. IL-4 (1, 10 and 100ng/ml) but not IL-13 induced a significant decrease in occludin and  
44 ZO-1 protein expression, ciliary beating efficiency, and wound repair rate in HNEC. Dupilumab had no  
45 effect on HNEC and specifically restored all epithelial functions altered when cells were exposed to an  
46 inflammatory environment, herein characterized by IL-4 exposure.

47 **Conclusion:** These results suggest that Dupilumab, by counteracting the effects of IL-4, restores  
48 epithelial cell functions such as barrier integrity, ciliary clearance, and wound repair rate. These results  
49 contribute to the understanding of its *in vivo* efficacy and support the epithelial dysregulation hypothesis  
50 in CRSwNP pathogenesis.

51

52 **Keywords:** CRSwNP; nasal polyposis; nasal epithelium; IL-4; IL-13; Dupilumab; ciliary beating  
53 efficiency; epithelial electrical resistance; tight junctions; repair rate; primary culture; epithelial barrier

## 54 1. Introduction

55 Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a chronic inflammatory disease of the  
56 airways characterized nasal obstruction and loss of smell, all of which negatively affect patients' health-  
57 related quality of life <sup>1</sup>. In Western Europe, up to 11% of the population is affected by CRSwNP <sup>2</sup>, and  
58 a type 2 (T2) inflammatory pattern is observed in 85% of CRSwNP cases <sup>3</sup>. It contributes to airway  
59 remodeling characterized by subepithelial fibrosis, edema, along with epithelial damage including goblet  
60 cell metaplasia and decreased ciliated cell differentiation <sup>1</sup>. The nasal epithelium is an important  
61 mechanical barrier and responds to environmental insults by inducing the production of T2 promoting  
62 cytokines <sup>4</sup>. To ensure their barrier function, neighboring human nasal epithelial cells (HNEC) are  
63 connected to one another via tight junctions (TJ) mostly constituted by occludin and zonula-occludens  
64 (ZO-1) <sup>5,6</sup>. In CRSwNP patients, loss of TJ function and/or expression has been observed<sup>7</sup>; the disruption  
65 of the epithelial barrier leads to a chronic inflammatory response that fails to resolve rather than a self-  
66 limited immune response <sup>8-11</sup>. T2 inflammation, epithelial dysfunction, and numerous cytokines appear  
67 to be key factors in the pathogenesis of CRSwNP and the formation of nasal polyps <sup>12-14</sup>.

68 IL-4 and IL-13 are key T2 cytokines with both distinct and overlapping functions as they share  
69 a common receptor subunit (IL-4 receptor  $\alpha$  subunit, IL-4R $\alpha$  <sup>15</sup>) and signaling pathways involving JAK1  
70 and STAT6. High levels of IL-4 and IL-13 have already been reported in the mucus of patients with  
71 CRSwNP <sup>16,17</sup> and both IL-4 and IL-13 are deeply involved in IgE synthesis, eosinophil activation,  
72 mucus secretion, and airway remodeling<sup>18-24</sup>. IL-4 has been shown to reduce the expression of the TJ  
73 proteins ZO-1 and occludin <sup>25</sup>, but these results remain debated as other authors did not find any impact  
74 of IL-4 on TJ <sup>26</sup>. IL-4 but not IL-13 was found to decrease wound repair rate (WRR) *in vitro* <sup>27</sup> and  
75 increase epithelial permeability <sup>26</sup>. Conversely, IL-4 and IL-13 were both shown to induce epithelial  
76 migration <sup>25</sup>. Dupilumab, a fully human monoclonal antibody (mAb) that binds IL4R $\alpha$ , thereby blocking  
77 signaling by both cytokines, has been shown to be effective in multiple T2 diseases (asthma, atopic  
78 dermatitis, and CRSwNP) <sup>28,29</sup>. On the one hand, IL-4 blockade potently prevents B- cell activation,  
79 IgE production, and pathogenic T- cell lung infiltration, while inhibition of IL-13 is required to prevent  
80 goblet cell metaplasia <sup>29</sup>. On the other hand, dual IL4/IL13 blockade is required to block T2 cell-induced  
81 antigen- presenting cell activation and the expression of inflammatory cytokines in the lungs *in vivo* <sup>29</sup>.  
82 All these results support the hypothesis that IL-4 impairs nasal epithelial functions, and that IL-13  
83 induces goblet cell metaplasia in T2 CRSwNP, making dupilumab an optimum treatment for T2  
84 diseases. Nevertheless, the direct effect of dupilumab on the nasal epithelial barrier remains unknown.

85 In the present study, we investigated the role of IL-4 and IL-13 on epithelial cell dysfunctions  
86 in CRSwNP to evaluate the potential effect of dupilumab. First, we analyzed the mRNA expression of  
87 IL-4, IL-13, and the protein expression of occludin in nasal polyps and control mucosa. Then, in primary  
88 cultures of HNEC at the air-liquid interface (ALI), we analyzed the mRNA expression pattern of IL-4  
89 receptors and the effect of IL-4, IL-13, and dupilumab on transepithelial electrical resistance (TEER),  
90 TJ protein expression, ciliary beating efficiency, and wound repair mechanisms.

## 91 **2. Methods**

### 92 *2.1 Tissue and cell collection, and primary culture of HNEC*

93 The nasal polyps and control mucosa (patients operated on for non-inflammatory disease of the  
94 paranasal sinuses) were each obtained from nine patients (agreement DC-20193746, December 2019)  
95 and frozen in liquid nitrogen before protein extraction. HNEC cultures were obtained from nasal polyps  
96 in 35 patients undergoing surgical procedure for CRSwNP. All the patients had given informed consent  
97 and the study was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01). The epithelial  
98 nature of ALI-cultured HNEC was confirmed by flow cytometry and cytokeratin 14  
99 immunofluorescence (IF) analysis. After intense proliferation during the first week, the HNEC reach  
100 their differentiated stage during the third week of culture in the presence of ciliated cells and secretory  
101 cells<sup>8,30</sup>. All the patients abstained from oral corticosteroids during one month before the surgery.  
102 Tissues were either frozen in liquid nitrogen before protein and nucleic acid extraction or immediately  
103 placed in culture medium and transported to the laboratory for HNEC isolation and culture. HNEC were  
104 isolated from nasal polyps as previously described by Coste *et al.*<sup>8</sup> (Appendix A). Dupilumab was used  
105 either isolated to evaluate its toxicity or in the presence of IL-4 to evaluate its therapeutic impact on  
106 nasal epithelial functions. In both situations, dupilumab was used at a concentration equivalent to that  
107 available in the tissue after a subcutaneous injection (0.04 mg/ml in the tissue, details in Appendix A).  
108 IL-6 is a multifunctional cytokine that plays an important role in inflammation and CRSwNP  
109 pathogenesis<sup>31</sup>. Dupilumab is an IgG4 of 147kDa, therefore we used a neutralizing monoclonal isotype  
110 antibody targeting human IL-6 (Anti IL-6, 145kDa, Invivogen, Toulouse, France) as a control to test the  
111 specificity of dupilumab effect.

### 112 *2.2 IL-4, IL-13 mRNA expression and occludin protein expression in nasal polyps and control tissue*

113 To evaluate IL-4 and IL-13 mRNA expression, total RNA from the nasal polyps and control  
114 mucosa was isolated using a NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Details appear  
115 in Appendix A. To evaluate occludin protein expression, western blot was performed as described in  
116 Appendix A.

### 117 *2.3 IL-4 receptor $\alpha$ mRNA expression in HNEC*

118 To evaluate IL-4 receptor mRNA expression in HNEC, total RNA from HNEC, after 21 days  
119 of culture, was isolated using a NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II kit (Macherey-Nagel), (Appendix A).

### 120 *2.4 Occludin protein expression in HNEC (western blot) with or without IL-4, IL-13, and dupilumab*

121 To evaluate the effects of IL-4, IL-13, and dupilumab on epithelial barrier function, we  
122 quantified *in vitro* the expression of occludin (a major constituent protein of TJ) using western blot, in  
123 cytokine-stimulated HNEC. For IL-4 and IL-13 stimulations, the 1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml  
124 concentrations were chosen according to previous studies on epithelial cells<sup>13,26,27,32</sup>. For all experiments  
125 regarding epithelial functions, cells treated with medium alone served as control and mAb (dupilumab  
126 and Anti IL-6) were used under the same concentration (0.04 mg/ml) for each cytokine concentration  
127 tested. After 48 h of stimulation, western blot was performed (Appendix A).

128 *2.5 ZO-1 protein expression in HNEC (immunolabeling) with or without IL-4, IL-13, and dupilumab*

129 After 48 h incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in complete medium (control conditions) or complete  
130 medium supplemented with IL (either IL-4, IL-13, or IL-4 with dupilumab), and after TEER  
131 measurements were performed (see below), cells were washed numerous times with PBS and then fixed  
132 for 10 min in 4% paraformaldehyde. Once fixed, wells corresponding to each condition were stored at  
133 4°C and available for labeling. Details regarding immunolabeling of ZO-1 (a major constituent of TJ)  
134 and labeling of actin appear in Appendix A. ZO-1 was chosen to study another major protein constituent  
135 of the TJ. To focus on the TJ belt, we chose to acquire all images at the apical pole of the cell.  
136 Immunolabeling and labeling were performed three times, but only single images are shown. In control  
137 or different stimulation conditions, we used the same parameters (labeling intensity and magnifications)  
138 for ZO-1 and actin expression, to ensure that a qualitative analysis could be performed.

139 *2.6 TEER in HNEC (EVOM) with or without IL-4, IL-13, and dupilumab*

140 TEER provides a physical measure of the electrical resistance across the epithelial cell barrier,  
141 and is widely used as an indicator of *in vitro* permeability<sup>33</sup>. TEER was measured using an epithelial  
142 volt ohm meter (EVOM) with an ENDOHM-12 electrode (World Precision Instruments, New Haven,  
143 CT, USA) as described previously<sup>34</sup> and in Appendix A.

144 *2.7 Ciliary beating efficiency in HNEC (high speed video microscopy) with or without IL-4, IL-13, and*  
145 *dupilumab*

146 The effect of IL-4 and IL-13 on the ciliary beat frequency (CBF) of respiratory epithelium has  
147 already been described and has been shown to contribute to the impaired mucociliary clearance *in vitro*  
148<sup>35</sup>. All analyses were performed at controlled room temperature (20–25 °C) *in vitro* in differentiated  
149 HNEC cultures as previously described<sup>34</sup> and detailed in Appendix A. As CBF is not the best tool to  
150 evaluate ciliary beating efficiency, we decided to use the efficiency index in the present study<sup>36,37</sup>.  
151 Therefore, microbead velocity was used as a marker of the flow generated by the ciliary beating to  
152 evaluate the shear stress induced by cilia on the fluid [mean ciliary efficiency index (in mPa)], as  
153 previously reported<sup>34,36,37</sup>.

154 *2.8 Wound repair rate in HNEC (time-lapse images) with or without IL-4, IL-13, and dupilumab*

155 The *in vitro* wound repair assay was carried out according to a model of mechanical injury  
156 adapted from a previously described method performed on fully differentiated cultures of HNEC<sup>38</sup>.  
157 Supplementary material is available (Appendix A). First, we evaluated the repair mechanism under  
158 stimulation of IL-4 or IL-13, then under stimulation with IL-4 and dupilumab.

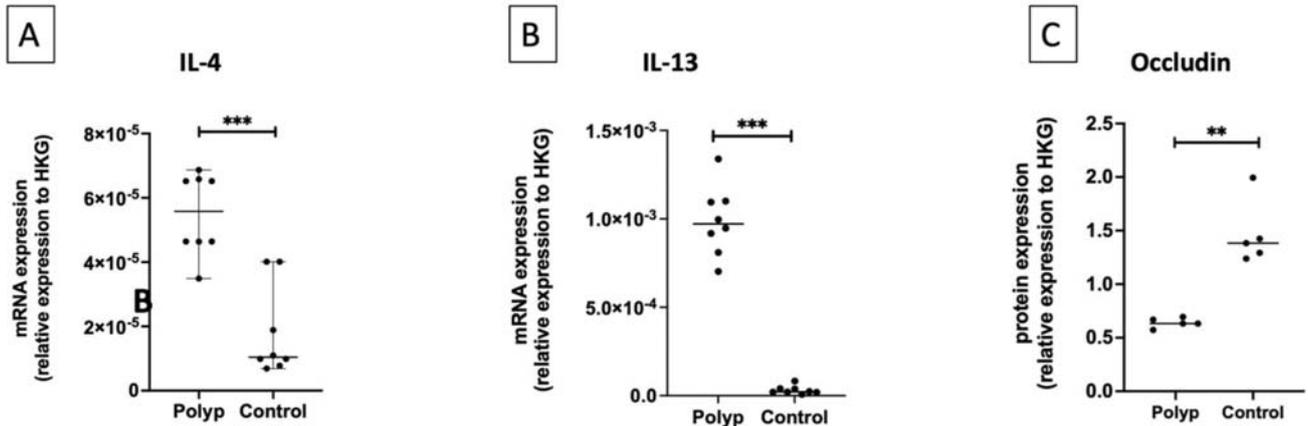
159 *2.9 Statistical analysis*

160 The statistical analyses were performed using the R software (v. 4.1.2, R Foundation for  
161 Statistical Computing, Vienna, Austria, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Details are described in Appendix A.

162 **3. Results**

163 *3.1 IL-4 and IL-13 were overexpressed and occludin protein expression was decreased in nasal polyps*

164 IL-4 and IL-13 mRNA were overexpressed in nasal polyps when compared to control mucosa  
165 ( $p=0.0006$  and  $p=0.0002$ , respectively; Figure 1A and 1B). The protein expression of occludin, a major  
166 constituent of TJ, was decreased in nasal polyps when compared to control mucosa ( $p=0.0159$ , Figure  
167 1C).

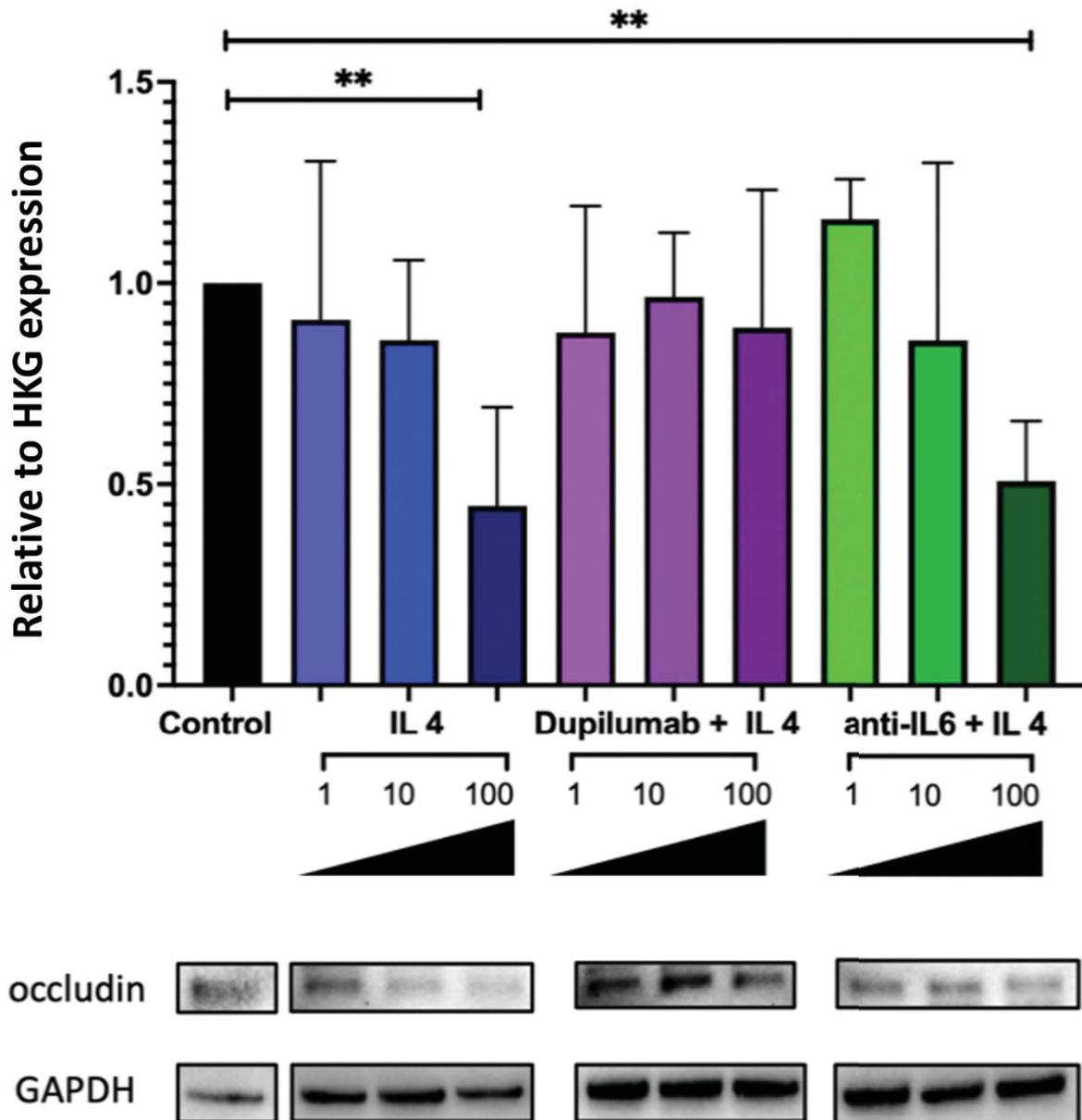


168 **Figure 1: IL-4 and IL-13 were overexpressed and occludin protein expression was decreased in**  
169 **nasal polyps.**

170 Analysis of the *ex vivo* expression of IL-4 and IL-13 ( $n=9$ ) by RT-qPCR (A and B) and the protein expression of occludin ( $n=5$ )  
171 (C), in nasal polyps and in non-inflammatory nasal mucosa (controls), using GAPDH as housekeeping gene (HKG) to  
172 normalize gene expression. The y-axis represents the relative expression normalized to HKG. \*\*\*  $p=0.0002$  (A),  $0.0006$  (B),  
173 and \*\*  $p=0.0159$  (C) using Mann Whitney test. Error bars correspond to the standard error of the mean.  
174

175 *3.3 IL-4 decreased occludin protein expression in HNEC and dupilumab counteracted this effect*

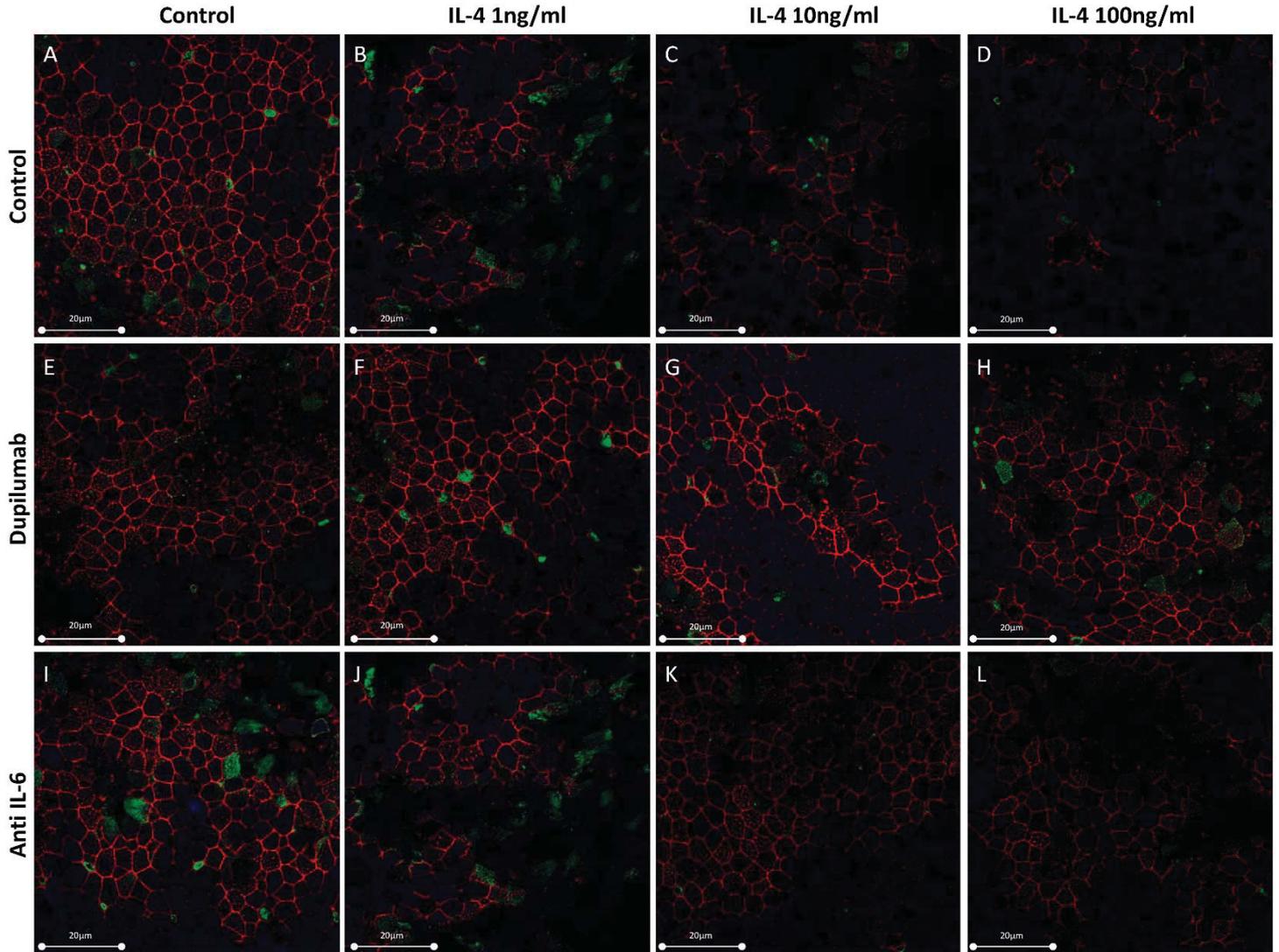
176 Firstly, we confirmed the mRNA expression of the IL-4R $\alpha$  in HNEC when compared to negative  
177 control (Figure S1). To evaluate the *in vitro* effect of IL-4 and IL-13 on epithelial barrier function, we  
178 stimulated HNEC with increasing concentrations of IL-4 or IL-13. In IL-4-stimulated HNEC, occludin  
179 expression was significantly decreased for IL-4 100 ng/mL concentration ( $p=0.0079$ ) when compared  
180 to control (Figure 2). No significant changes were observed with IL-13. Dupilumab counteracted the  
181 decreased expression of occludin in IL-4-stimulated HNEC whereas Anti IL-6 had no effect (Figure 2).  
182 ALI cultures of HNEC stimulated on Day 21 with IL-4 1, 10, and 100 ng/ml for 48h showed a decrease  
183 in ZO-1 labeling (Figure 3A, B, C and D), whereas no significant changes were observed with IL-13  
184 (Figure S2). The effects of IL-4 were specifically counteracted by dupilumab (Figure 3F, G and H).



185  
 186  
 187  
 188  
 189  
 190  
 191

**Figure 2: IL-4 reduced the expression of occludin in HNEC and dupilumab counteracted this effect.**

Occludin (n=5) relative protein expression was analyzed by western blotting using GAPDH as HKG to normalize protein expression. The y-axis represents the relative expression normalized to HKG. Comparisons were made between groups \*\* p=0.0079. Statistical analyses were performed using Wilcoxon test. Error bars correspond to the standard error of the mean. HKG, House Keeping Gene; GAPDH, glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase; IL, Interleukin.



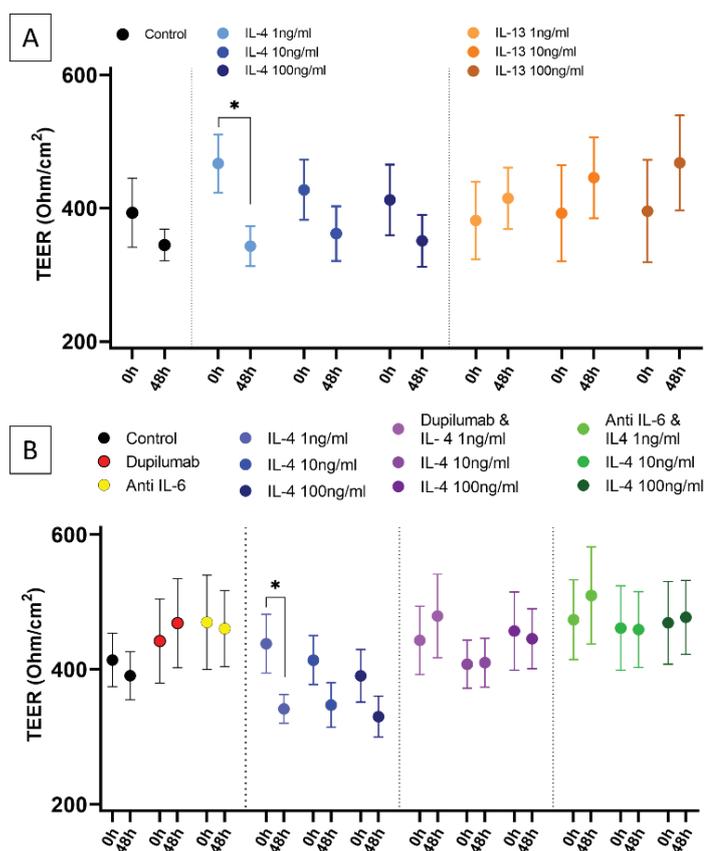
192

193 **Figure 3. IL-4 reduced the expression of ZO-1 in HNEC and dupilumab counteracted this effect.**

194 ALI cultures of HNEC were stimulated on Day 21 with IL-4 1, 10, and 100ng/ml with or without dupilumab or anti-IL-6 during  
 195 48 hours. ZO-1 (red) expression after immunolabeling, actin fiber labeling (green), and nuclear 4',6-diamidino-2-phénylindole  
 196 (DAPI) labeling (blue) without any stimulation, control well (A), with stimulation by IL-4 at 1 ng/ml (B), 10 ng/ml (C), and  
 197 100 ng/ml (D); and Dupilumab alone (E) or with IL-4 at 1 ng/ml (F), at 10 ng/ml (G), and 100 ng/ml (H); and Anti IL-6 alone  
 198 (I) or with IL-4 at 1 ng/ml (J), at 10 ng/ml (K), and 100 ng/ml (L) are shown. To focus on the TJ belt, observations were made  
 199 at the apical pole of the cell, DAPI and actin labeling can therefore not be characterized. The analysis was performed on ZO-1  
 200 protein expression, a major constituent of TJ.

201 3.3 IL-4 but not IL-13 decreased TEER in HNEC

202 The mean  $\pm$  SEM baseline TEER measurement across all culture wells used for the analysis was  
 203  $411 \pm 144$  ohms/cm<sup>2</sup> (n=8, 64 wells, Figure 4A) prior to cytokine exposure. The control well experiments  
 204 showed a mild decrease in TEER over the 48 hours of cytokine exposure (92.7% of baseline values,  
 205  $381 \pm 112$  ohms/cm<sup>2</sup> at 48h; Figure 4A). After 48h of cytokine exposure, only IL-4 1ng/ml exposure  
 206 revealed a significant decrease in TEER (73.4% of baseline values,  $343 \pm 89$  ohms/cm<sup>2</sup> at 48h vs.  
 207  $467 \pm 130$  ohms/cm<sup>2</sup> at baseline, p=0.05; Figure 4A). No difference was observed at 48h for IL-13 at all  
 208 concentrations tested when compared with unstimulated controls (p>0.05; Figure 4A). Experiments  
 209 were pursued with IL-4  $\pm$  dupilumab or Anti IL-6 as negative control (Figure 4B). The baseline TEER  
 210 measurement across all culture wells used for the analysis was  $448 \pm 123$  ohms/cm<sup>2</sup> (n=6, 72 wells; Figure  
 211 4B) prior to cytokine exposure. After 48h of cytokine exposure, only IL-4 1ng/ml exposure  
 212 demonstrated a significant decrease in TEER (77.5% of baseline values,  $379 \pm 85$  ohms/cm<sup>2</sup> at 48h vs.  
 213  $489 \pm 65$  ohms/cm<sup>2</sup> at baseline, p=0.041; Figure 4B). In the presence of dupilumab or Anti IL-6, no  
 214 decrease in TEER after 48h of IL-4 exposure was observed at all concentrations tested.

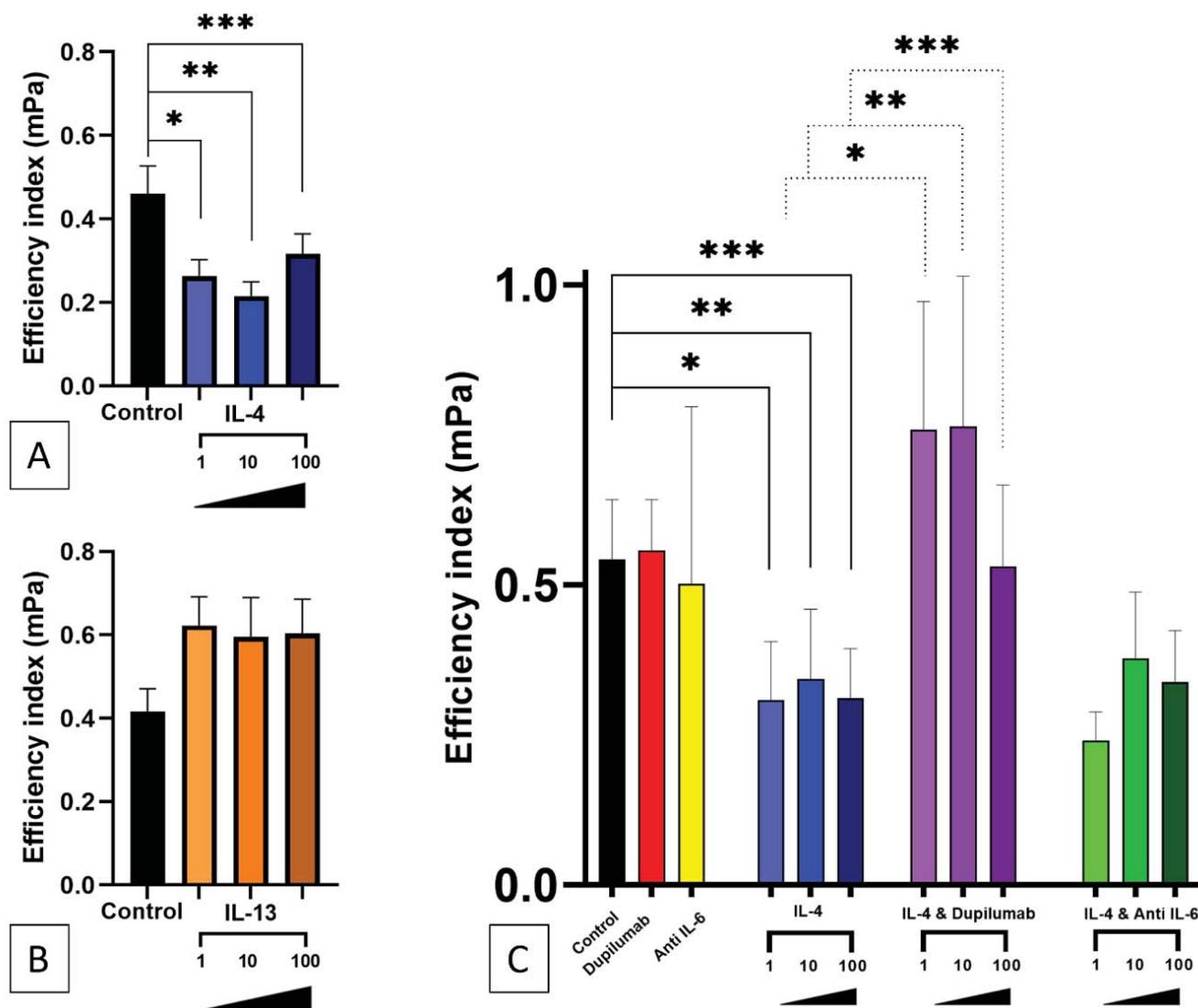


215 **Figure 4: IL-4 but not IL-13 decreased TEER in HNEC.**

216 ALI cultures of HNEC were stimulated on Day 21 with IL-4 or IL-13 1, 10, and 100ng/ml during 48h and compared to  
 217 unstimulated cultures. TEER measurements in unstimulated controls (black), IL-4 1ng/ml (light blue), IL-4 10ng/ml (blue),  
 218 and IL-4 100ng/ml (dark blue), IL-13 1ng/ml (light orange), IL-13 10ng/ml (orange), and IL-13 100ng/ml (dark orange), IL-4  
 219 with dupilumab (light purple, purple, an dark purple), IL-4 with Anti IL-6 (light green, green, and dark green) were expressed  
 220 in ohms/cm<sup>2</sup>. IL-4 at 1ng/ml exposure demonstrated a significant decrease in TEER whereas IL-13 had no effect. Effect of IL-  
 221 4 was counteracted by dupilumab and Anti-IL6. Figure A \*p=0.05, and Figure B \*p= 0.041. Statistical analyses were performed  
 222 using Wilcoxon test. Error bars correspond to the standard error of the mean.

223 3.4 IL-4 decreased the ciliary beating efficiency in HNEC and dupilumab counteracted this effect

224 The *in vitro* dose–response effect of IL-4 and IL-13 on ciliary beating efficiency was evaluated  
225 in 6 independent primary cultures corresponding to 84 wells (IL-4 and IL-13 were tested at 1ng/ml,  
226 10ng/ml, and 100ng/ml). After 48h of stimulation, the mean ciliary efficiency index was  $0.461 \pm 0.16$ mPa  
227 in the control wells. A significant decrease was observed with 1, 10, and 100ng/ml IL-4 exposure in  
228 comparison to control wells ( $0.264 \pm 0.09$ mPa,  $0.216 \pm 0.08$ mPa, and  $0.317 \pm 0.11$ mPa,  $p=0.03$ ,  $p=0.12$ ,  
229 and  $p=0.04$ , respectively; Figure 5A). No significant change was observed at 48h for IL-13 at all  
230 concentrations tested when compared with unstimulated controls (Figure 5B). With IL-4 ± dupilumab  
231 or Anti IL-6 as negative control (n=6, 72 wells, Figure 5C), the mean ciliary index was  $0.542 \pm 0.24$ mPa,  
232  $0.557 \pm 0.20$ mPa, and  $0.501 \pm 0.72$ mPA, for the control, dupilumab, and Anti IL-6 wells, respectively. IL-  
233 4 stimulation significantly reduced the mean ciliary efficiency index at all concentrations tested when  
234 compared with the unstimulated control (solid line, Figure 5C). Dupilumab significantly counteracted  
235 the effect of IL-4 on ciliary beating for each concentration tested and Anti IL-6 had no effect (dotted  
236 line, Figure 5C).



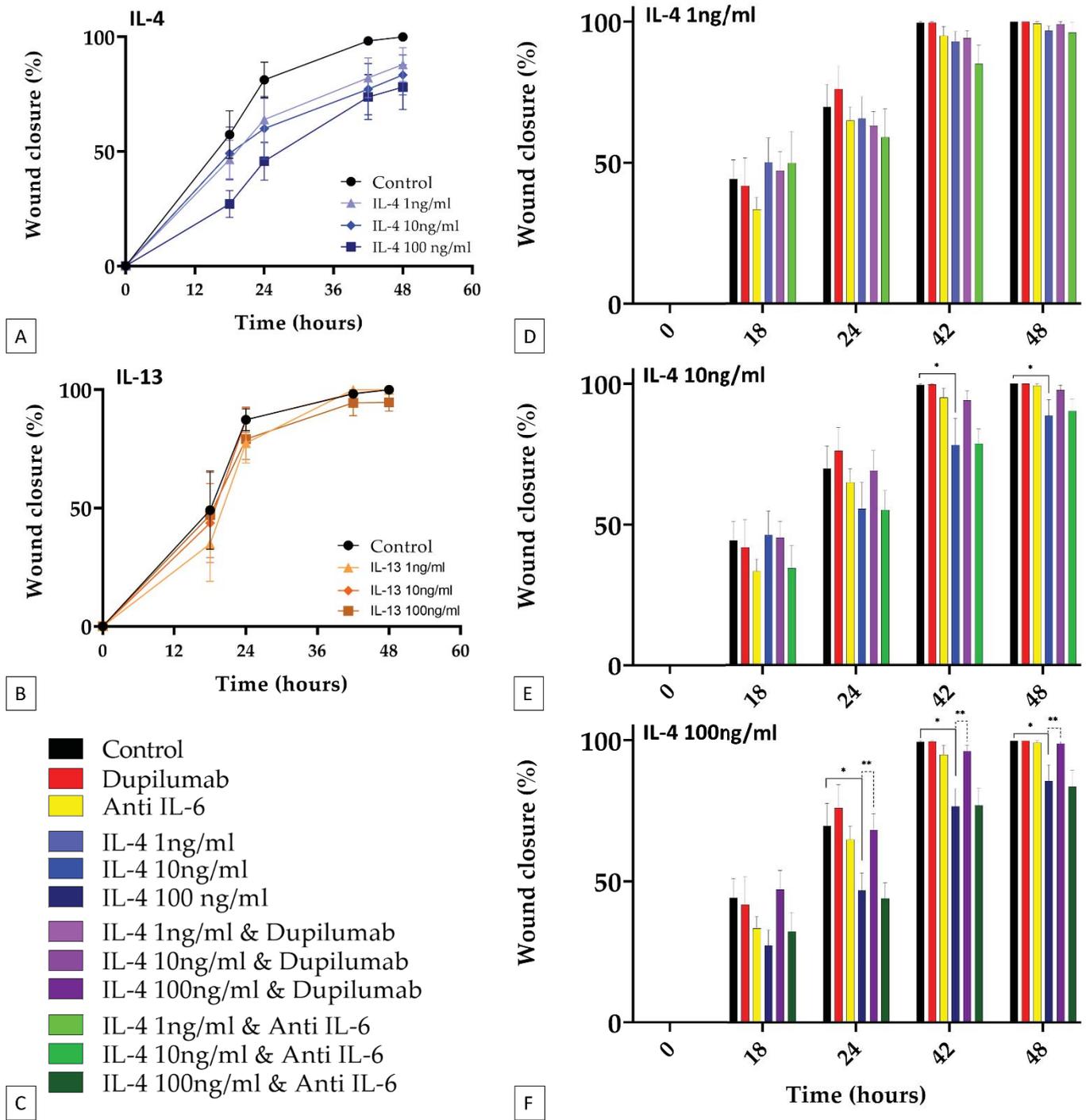
237

238 **Figure 5: IL-4 decreased the ciliary beating efficiency and dupilumab *in vitro* counteracted this**  
 239 **effect.**

240 The ciliary beating efficiency (mPa) was evaluated after 48h of IL-4 (light blue, blue, and dark blue) (A) and IL-13 (light  
 241 orange, orange, dark orange) (B) stimulation at various concentrations (1ng/ml, 10ng/ml, and 100ng/ml) and compared with  
 242 unstimulated controls (black; n=6). Stimulation of HNEC with IL-4 at 1 ng/ml, 10ng/ml, and 100ng/ml decreased ciliary beating  
 243 efficiency (\*p<0.05). The ciliary beating efficiency (mPa) was then evaluated after 48h of stimulation with IL-4 (light blue,  
 244 blue, and dark blue), IL-4 with dupilumab (light purple, purple, dark purple) and IL-4 with Anti IL-6 (light green, green, and  
 245 dark green) at various concentrations of IL-4 for each group (1ng/ml, 10ng/ml, and 100ng/ml) (C). Comparisons were made  
 246 with unstimulated controls (black; n=6, \*p=0.005, \*\*p=0.03, and \*\*\*p=0.007). The effect of IL-4 was counteracted specifically  
 247 by dupilumab (respectively, \*p=0.003, \*\*p=0.016, and \*\*\*p=0.003) but not by Anti IL-6. Statistical analyses were performed  
 248 using Wilcoxon test. Error bars correspond to the standard error of the mean.

249 *3.5 IL-4 decreased the wound repair rate in HNEC and dupilumab counteracted this effect*

250 The *in vitro* effect of IL-4 and IL-13 was evaluated in 3 independent primary cultures  
251 corresponding to 24 wells that were wounded. As shown in Figure 6A, IL-4 seemed to decrease the  
252 WRR from 18h post-stimulation onwards while no significant effect on the WRR was observed with  
253 IL-13 (n=3, no statistical analysis, Figure 6A and B). Experiments were pursued with IL-4 ± dupilumab,  
254 or Anti IL-6 as negative control (n=6, 72 wells, Figure 6C). In each condition tested, the initial wound  
255 areas were similar (213±51 pixels for unstimulated controls vs. 220±55 pixels for IL-4 stimulated wells,  
256 p=0.493; vs. 206±73 pixels for dupilumab stimulated wells, p=0.889; and vs. 211±37 pixels for Anti-  
257 IL-6 stimulated wells, p=0.974). No effect on the WRR was observed with IL-4 1ng/ml (Figure 6D).  
258 The stimulation of HNEC with IL-4 10ng/ml decreased the WRR at 42h and 48h (Figure 6E). A decrease  
259 in the WRR was also observed with IL-4 100ng/ml at 24h, 42h, and 48h (Figure 6F). The decrease in  
260 WRR observed after stimulation by IL-4 10ng/ml and 100 ng/ml was normalized by dupilumab (Figure  
261 6E and F). The WRR of the 100 ng/ml IL-4 + dupilumab stimulated group was significantly higher than  
262 the IL-4 100ng/ml stimulated group (68.3±17.3% vs. 46.9±18.4% at 24h, p=0.022; 96.3±6.4% vs.  
263 76.7±18.9% at 42h, p= 0.006; 99.0±2.4% vs. 85.7±17.0% et 48h, p=0.010, respectively; Figure 6F).  
264 Dupilumab alone and Anti-IL-6 alone had no effect on WRR (Figure 6D, E, and F).



265 **Figure 6: IL-4 decreased the wound repair rate *in vitro* and dupilumab counteracted this effect.**  
 266 The repair rate was evaluated as the proportion of the wounded area closed at each time point for IL-4 and IL-13 stimulated  
 267 wells (either 1ng/ml, 10ng/ml, or 100ng/ml) and compared to the one of unstimulated control wells, first for IL-4 (n=3) (A)  
 268 and IL-13 (n=3) (B) alone to test their effect on HNEC (no statistical analysis performed). Then experiments were pursued  
 269 with IL-4, dupilumab, or IL-4 associated with dupilumab (n=5) (C-F). Statistical analyses were performed using Wilcoxon test.  
 270 Error bars correspond to the standard error of the mean. No effect on the WRR was observed with IL-4 1ng/ml (D). At 42h and  
 271 48h, the 10 ng/ml IL-4 stimulated group had a lower repair rate than the unstimulated control group ( $76.7 \pm 18.9\%$  vs.  $99.5 \pm 1.4\%$   
 272 at 42h,  $p=0.001$ ;  $88.6 \pm 16.9\%$  vs.  $100.0 \pm 0.0\%$  at 48h,  $p=0.013$ ), (E). When adding dupilumab, the WRR was normalized (E).  
 273 At 24h, 42h, and 48h, the 100ng/ml IL-4 stimulated group had a lower repair rate than the unstimulated control group  
 274 ( $46.9 \pm 18.4\%$  vs.  $69.8 \pm 23.9\%$ ,  $p=0.037$  at 24h;  $76.7 \pm 18.9\%$  vs.  $99.5 \pm 1.4\%$  at 42h,  $p=0.001$ ;  $85.7 \pm 17.0\%$  vs.  $100.0 \pm 0.0\%$   
 275 at 48h,  $p=0.001$ ). When adding dupilumab, the WRR was normalized and the 100 ng/ml IL-4 + dupilumab stimulated group had  
 276 a higher repair rate than the 100 ng/ml IL-4 stimulated group ( $68.3 \pm 17.3\%$  vs.  $46.9 \pm 18.4\%$  at 24h,  $p=0.022$ ;  $96.3 \pm 6.4\%$  vs.  
 277  $76.7 \pm 18.9\%$  at 42h,  $p=0.006$ ;  $99.0 \pm 2.4\%$  vs.  $85.7 \pm 17.0\%$  at 48h,  $p=0.010$ , for IL-4 100ng/ml + dupilumab vs. IL-4 100ng/ml  
 278 alone respectively), (F). \* Indicates statistical significance between control and IL-4 stimulated wells ( $p < 0.05$ ), \*\* between IL-  
 279 4 and IL-4 + dupilumab stimulated wells.

#### 280 4. Discussion

281 The present results show an increased mRNA expression of IL-4 and IL-13 and a reduced  
282 protein expression of occludin in nasal polyps, as well as an expression of IL-4R $\alpha$  in HNEC. After IL-  
283 4 or IL-13 stimulation, IL-4 but not IL-13 had a significant effect on different epithelial functions: IL-4  
284 decreased ZO-1 and occludin expression, TEER, ciliary beating efficiency, and WRR. Dupilumab alone  
285 had no effect on HNEC but specifically counteracted the effect of IL-4 on all epithelial functions tested.

286 In the present study, the 3 increasing concentrations of IL-4 and IL-13 used to analyze the dose-  
287 response effect were chosen based on previous *in vitro* studies using other cytokines<sup>13,34,39</sup>. Conversely  
288 to the reported decrease in CBF and impairment in lateral cell contacts induced by IL-13<sup>19</sup>, no effect  
289 was observed herein. As such, and based on the results from Wise *et al.* who reported no effect of IL-  
290 13 on TEER<sup>26</sup>, we thus chose IL-4 as the working cytokine to test the effect of dupilumab in HNEC.  
291 Although IL-4 and IL-13 both belong to the same family of cytokines sharing the IL-4R $\alpha$  subunit, the  
292 present study highlighted their different functional properties<sup>15</sup>. These are possibly due to the specific  
293 and complex interactions of each cytokine with their common receptor<sup>15</sup> but also to the multiple and  
294 different signaling pathways that are activated following their interaction with the other receptor  
295 subunit<sup>40</sup>. *In vivo*, IL-4 is known to be a regulator of T2 lymphocyte differentiation and class switching  
296 of B cells (IgG1 to IgE)<sup>41</sup>, which is in line with its direct *in vitro* effect on several epithelial functions  
297 reported herein.

298 CRSwNP is the result of a chronic nasal inflammatory response triggered by airway epithelial  
299 disruption regardless of the initial environmental insult<sup>7,13,14,42,43</sup>. This insult, such as fungi, bacteria, or  
300 pathogen-associated molecular patterns, could increase cytokine expression in nasal polyps<sup>12</sup>. In this  
301 study, we confirmed that IL-4 and IL-13 mRNA are overexpressed in nasal polyps<sup>41</sup> in comparison to  
302 control mucosa. The TJ proteins, including occludin and ZO-1, establish the polarity of the epithelial  
303 cell layer by forming a seal between adjacent epithelial cells<sup>7,44</sup> and are crucial in ensuring the efficacy  
304 of the epithelial barrier function. Both IL-4 and IL-13 are supposed to decrease the expression of TJ  
305 proteins *in vitro*<sup>26</sup> and therefore, contribute to the alteration of the epithelial barrier described in  
306 CRSwNP<sup>26,27</sup>. However, we only observed a decrease in occludin protein expression and ZO-1  
307 immunolabeling in HNEC under IL-4 stimulation, in accordance with Wise *et al.* Similarly, a decrease  
308 in TEER was observed with IL-4 but not IL-13. Muco-ciliary clearance represents a key step in the  
309 defense capacity of the airway epithelium and could be altered in CRSwNP<sup>19,20,35,45</sup>. Previous studies  
310 demonstrated that IL-4 and IL-13 both significantly reduced CBF<sup>20,35</sup> and that IL-13 reduced cell  
311 differentiation in HNECs from CRSwNP patients<sup>20</sup>. The decrease in ciliary function therefore  
312 contributes to the persistence of pathogens at the apical pole of epithelial cells and the maintenance of  
313 the inflammatory state. In the present study, IL-4 but not IL-13 significantly reduced the mean ciliary  
314 efficiency index when compared to controls. These results differ from those reported by Jiao *et al.* who  
315 found an effect of IL-13 on CBF when studying the proportion of ciliated cells<sup>20</sup>, a parameter that is  
316 less specific than the efficiency index for CRSwNP<sup>34,36,37</sup>. In another study, the RNA sequencing of

317 sinus epithelial brushings from CRSwNP patients found an increase in tuft cell transcripts and a decrease  
318 in ciliated cells after IL-13 stimulation, but the ciliary beating efficiency per se was not studied<sup>24</sup>. As  
319 TJ alterations are directly correlated with cell migration and epithelial wound healing<sup>46-48</sup>, we expected  
320 results similar to those described by Wise *et al.*, that is an effect with IL-4 but not IL-13. A link between  
321 a decreased WRR and a decreased ciliary beating efficiency could be drawn under the hypothesis of a  
322 complete loss of usual function of the epithelium when exposed to an inflammatory environment, herein  
323 characterized by IL-4 exposure.

324 In nasal polyps, a defective epithelial barrier has been reported with decreased tissue resistance  
325 and decreased expression of TJ proteins<sup>7</sup>. The rupture of the epithelial continuity is one of the numerous  
326 hypothesis underlying the CRSwNP pathogenesis since 1977<sup>49</sup>. Therefore, restoring the integrity of the  
327 epithelial barrier after environmental insults would be a key element for improving the defense  
328 capabilities of the respiratory epithelium. In the present study, the presence of dupilumab specifically  
329 restored all epithelial functions (TJ protein expression, ciliary beating efficiency, and WRR) altered by  
330 IL-4 stimulations; its effect on TEER measurements, however, was not specific. We could suggest that  
331 *in vitro*, a decreased TEER under IL-4 exposure is normalized in the presence of mAb, specific  
332 (dupilumab) or not (Anti IL-6), partly due to the sensitivity of HNEC to their environment. Importantly,  
333 the WRR was normalized by dupilumab and not Anti IL-6, as soon as 24h post-stimulation, when HNEC  
334 were exposed to IL-4 100ng/ml. Despite the wound closure normalization by dupilumab for IL-4  
335 10ng/ml stimulations at 42h and 48h, the latter was not significant. It seems that the higher the  
336 concentration of IL-4, the more powerful the counter effect of dupilumab. Finally, no effect of  
337 dupilumab was demonstrated *in vitro* on HNEC. Future studies measuring the *ex vivo* effects of  
338 dupilumab on epithelial functions could be of great interest to improve our knowledge of these mAb,  
339 thereby providing insights on the choice of appropriate therapies.

340 **5. Conclusion**

341 In summary, we showed that dupilumab, *in vitro*, restored epithelial integrity by counteracting the IL-4  
342 effect on the epithelial barrier (increased epithelial permeability, decreased ciliary beating efficiency,  
343 and decreased WRR). The present data suggest that therapeutic inhibition of IL-4R $\alpha$  and its downstream  
344 signaling could be advantageous in the treatment of mucosal diseases associated with T2 inflammation.  
345 These findings suggest that the efficacy of dupilumab is underlined by its capacity to restore the  
346 epithelial barrier function, increase the ciliary beating efficiency, and increase the WRR. Besides its  
347 effects on T2 inflammation, dupilumab also contributes to reducing the chronic inflammatory state and  
348 epithelial damage, which are key features of CRSwNP pathophysiology.

349 **Declarations**

350 **Ethics approval and consent to participate:** The study was approved by the Institutional Ethics  
351 Committee on Human Experimentation of the University Hospital of Poitiers and received the  
352 agreement of the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” (DC-20193746,  
353 December 2019). Regarding primary culture of human nasal epithelial cells, all the patients had given  
354 informed consent and the study was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01).

355 **Consent for publication:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

356 **Availability of data and material:** Data supporting reported results can be found in the Laboratoire  
357 Inflammation Tissus Epithéliaux et Cytokines (LITEC), UR15560, Université de Poitiers, 86000  
358 Poitiers and in the Laboratoire de l’Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955, CNRS  
359 EMR 7000, 93000 Créteil.

360 **Conflict of interest:** MF, EB, FC, XD, and AC have received honoraria from Sanofi and GlaxoSmith.  
361 All other authors have no competing interests in relation to this work.

362 **Funding:** This work was partly supported by a grant from « la Société Française d’Oto-rhino-  
363 laryngologie et de chirurgie cervico-faciale (SFORL) », « le Collège Français d’Oto-rhino-laryngologie  
364 et de chirurgie cervico-faciale (CFORL&CCF) » and Amplifon.

365 **Author Contributions:** Conceptualization, E.B., L.F., M.F., S.T., A.C., J.C.L., F.C, and Y.B.; data  
366 curation, M.F., F.C, and Y.B.; formal analysis, E.B., M.F., L.F., S.B., X.D., M.B., B.L., F.C, and Y.B.;  
367 methodology, A.C., E.B., M.F., F.C, and Y.B.; project administration, A.C., B.L., E.B and L.F.;  
368 resources, B.L. and L.F.; software, M.F. and B.L.; supervision, B.L., L.F., E.B., S.T., X.D., J.C.L., and  
369 A.C.; validation, E.B. and L.F; visualization, A.C., X.D. and S.T.; writing—original draft, M.F., F.C,  
370 Y.B., E.B., J.C.L., and L.F.; writing—review and editing, E.B., L.F., A.C., J.C.L., M.F., S.T., X.D.,  
371 M.B. and F.C, Y.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

372 **Acknowledgements:** The authors are thankful to all members of the lab in Poitiers and Créteil. We also  
373 thank Véréna Landel (Direction de le Recherche en Santé, Hospices Civils de Lyon) for her help in  
374 manuscript preparation.

375 **References**

- 376 1. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position  
377 Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*. 2020;58:1–464.
- 378 2. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, et al. Chronic  
379 rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA<sup>2</sup>LEN study. *Allergy*. 2011;66:1216–  
380 23.
- 381 3. Tomassen P, Vandeplass G, Van Zele T, Cardell LO, Arebro J, Olze H, et al. Inflammatory  
382 endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin  
383 Immunol*. 2016;137:1449-1456.e4.
- 384 4. Laidlaw TM, Mullol J, Woessner KM, Amin N, Mannent LP. Chronic Rhinosinusitis with Nasal  
385 Polyps and Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9:1133–41.
- 386 5. Steelant B, Seys SF, Boeckxstaens G, Akdis CA, Ceuppens JL, Hellings PW. Restoring airway  
387 epithelial barrier dysfunction: a new therapeutic challenge in allergic airway disease. *Rhinology*.  
388 2016;54:195–205.
- 389 6. Georas SN, Rezaee F. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and  
390 allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:509–20.
- 391 7. Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, Holzmann D, Treis A, Wanke K, et al. Defective  
392 epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN- $\gamma$  and IL-4. *J  
393 Allergy Clin Immunol*. 2012;130:1087-1096.e10.
- 394 8. Coste A, Brugel L, Maître B, Boussat S, Papon JF, Wingerstmann L, et al. Inflammatory cells as  
395 well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur Respir J*.  
396 2000;15:367–72.
- 397 9. Coste A, Wang QP, Roudot-Thoraval F, Chapelin C, Bedbeder P, Poron F, et al. Epithelial cell  
398 proliferation in nasal polyps could be up-regulated by platelet-derived growth factor. *The  
399 Laryngoscope*. 1996;106:578–83.
- 400 10. Pothoven KL, Norton JE, Hulse KE, Suh LA, Carter RG, Rocci E, et al. Oncostatin M promotes  
401 mucosal epithelial barrier dysfunction, and its expression is increased in patients with  
402 eosinophilic mucosal disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:737-746.e4.
- 403 11. Wladislavosky-Waserman P, Kern EB, Holley KE, Eisenbrey AB, Gleich GJ. Epithelial damage  
404 in nasal polyps. *Clin Allergy*. 1984;14:241–7.
- 405 12. Carsuzaa F, Béquignon É, Dufour X, de Bonnecaze G, Lecron JC, Favot L. Cytokine Signature  
406 and Involvement in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Int J Mol Sci*. 2021;23:417.
- 407 13. Bequignon E, Mangin D, Bécaud J, Pasquier J, Angely C, Bottier M, et al. Pathogenesis of  
408 chronic rhinosinusitis with nasal polyps: role of IL-6 in airway epithelial cell dysfunction. *J  
409 Transl Med*. 2020;18:136.
- 410 14. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position  
411 Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*. 2020;58:1–464.
- 412 15. LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, et al. Molecular and structural  
413 basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell*. 2008;132:259–72.

- 414 16. Longino ES, Labby AB, Wu J, Chapurin N, Li P, Chandra RK, et al. Association of cytokine  
415 profile with prior treatment failure and revision surgery in chronic rhinosinusitis. *Int Forum*  
416 *Allergy Rhinol.* 2023;13:5–14.
- 417 17. Chowdhury NI, Chandra RK, Li P, Ely K, Turner JH. Investigating the correlation between  
418 mucus cytokine levels, inflammatory cell counts, and baseline quality-of-life measures in  
419 chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019;9:538–44.
- 420 18. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13:  
421 central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998;282:2258–61.
- 422 19. Laoukili J, Perret E, Willems T, Minty A, Parthoens E, Houcine O, et al. IL-13 alters  
423 mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *J Clin Invest.*  
424 2001;108:1817–24.
- 425 20. Jiao J, Duan S, Meng N, Li Y, Fan E, Zhang L. Role of IFN- $\gamma$ , IL-13, and IL-17 on mucociliary  
426 differentiation of nasal epithelial cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp*  
427 *Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* 2016;46:449–60.
- 428 21. Gomperts BN, Kim LJ, Flaherty SA, Hackett BP. IL-13 regulates cilia loss and foxj1 expression  
429 in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37:339–46.
- 430 22. Kano H, Tanabe T, Rubin BK. IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell  
431 differentiation is steroid resistant in human airway cells. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin*  
432 *Immunol.* 2011;41:1747–56.
- 433 23. Jiang H, Harris MB, Rothman P. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin*  
434 *Immunol.* 2000;105:1063–70.
- 435 24. Kotas ME, Patel NN, Cope EK, Gurrola JG, Goldberg AN, Pletcher SD, et al. IL-13-associated  
436 epithelial remodeling correlates with clinical severity in nasal polyposis. *J Allergy Clin*  
437 *Immunol.* 2023;151:1277–85.
- 438 25. Lee SN, Ahn JS, Lee SG, Lee HS, Choi AMK, Yoon JH. Integrins  $\alpha\beta 5$  and  $\alpha\beta 6$  Mediate IL-4-  
439 induced Collective Migration in Human Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.*  
440 2019;60:420–33.
- 441 26. Wise SK, Laury AM, Katz EH, Den Beste KA, Parkos CA, Nusrat A. Interleukin-4 and  
442 interleukin-13 compromise the sinonasal epithelial barrier and perturb intercellular junction  
443 protein expression. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014;4:361–70.
- 444 27. Wise SK, Den Beste KA, Hoddeson EK, Parkos CA, Nusrat A. Sinonasal epithelial wound  
445 resealing in an in vitro model: inhibition of wound closure with IL-4 exposure. *Int Forum*  
446 *Allergy Rhinol.* 2013;3:439–49.
- 447 28. Gandhi NA, Pirozzi G, Graham NMH. Commonality of the IL-4/IL-13 pathway in atopic  
448 diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13:425–37.
- 449 29. Le Floc’h A, Allinne J, Nagashima K, Scott G, Birchard D, Asrat S, et al. Dual blockade of IL-4  
450 and IL-13 with dupilumab, an IL-4R $\alpha$  antibody, is required to broadly inhibit type 2  
451 inflammation. *Allergy.* 2020;75:1188–204.
- 452 30. Papon JF, Coste A, Gendron MC, Cordonnier C, Wingerstmann L, Peynègre R, et al. HLA-DR  
453 and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *The Laryngoscope.*  
454 2002;112:2067–75.

- 455 31. Bequignon E, Mangin D, Bécaud J, Pasquier J, Angely C, Bottier M, et al. Pathogenesis of  
456 chronic rhinosinusitis with nasal polyps: role of IL-6 in airway epithelial cell dysfunction. *J*  
457 *Transl Med.* 2020;18:136.
- 458 32. Cho SH, Kim DW, Lee SH, Kolliputi N, Hong SJ, Suh L, et al. Age-related increased prevalence  
459 of asthma and nasal polyps in chronic rhinosinusitis and its association with altered IL-6 trans-  
460 signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53:601–6.
- 461 33. Klingberg TD, Pedersen MH, Cencic A, Budde BB. Application of measurements of  
462 transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic  
463 activity. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:7528–30.
- 464 34. Carsuzaa F, Bequignon E, Bartier S, Coste A, Dufour X, Binaud M, et al. Oncostatin M  
465 Contributes to Airway Epithelial Cell Dysfunction in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps.  
466 *Int J Mol Sci.* 2023;24:6094.
- 467 35. Grosse-Onnebrink J, Werner C, Loges NT, Hörmann K, Blum A, Schmidt R, et al. Effect of  
468 TH2 cytokines and interferon gamma on beat frequency of human respiratory cilia. *Pediatr Res.*  
469 2016;79:731–5.
- 470 36. Bottier M, Blanchon S, Pelle G, Bequignon E, Isabey D, Coste A, et al. A new index for  
471 characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part I, experimental  
472 analysis. *PLoS Comput Biol.* 2017;13:e1005605.
- 473 37. Bottier M, Peña Fernández M, Pelle G, Isabey D, Louis B, Grotberg JB, et al. A new index for  
474 characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part II, modeling. *PLoS*  
475 *Comput Biol.* 2017;13:e1005552.
- 476 38. Lechapt-Zalcman E, Prulière-Escabasse V, Advenier D, Galiacy S, Charrière-Bertrand C, Coste  
477 A, et al. Transforming growth factor-beta1 increases airway wound repair via MMP-2  
478 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*  
479 2006;290:L1277-1282.
- 480 39. Boniface K, Diveu C, Morel F, Pedretti N, Froger J, Ravon E, et al. Oncostatin M secreted by  
481 skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation. *J*  
482 *Immunol Baltim Md* 1950. 2007;178:4615–22.
- 483 40. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor  
484 Complexes. *Front Immunol.* 2018;9:888.
- 485 41. Zhang Y, Derycke L, Holtappels G, Wang XD, Zhang L, Bachert C, et al. Th2 cytokines  
486 orchestrate the secretion of MUC5AC and MUC5B in IL-5-positive chronic rhinosinusitis with  
487 nasal polyps. *Allergy.* 2019;74:131–40.
- 488 42. Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al.  
489 Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy.*  
490 2006;61:1280–9.
- 491 43. Kariyawasam HH. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps: insights into mechanisms of disease  
492 from emerging biological therapies. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019;15:59–71.
- 493 44. Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight  
494 junctions. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778:588–600.

- 495 45. Wynne M, Atkinson C, Schlosser RJ, Mulligan JK. Contribution of Epithelial Cell Dysfunction  
496 to the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Am J Rhinol Allergy*.  
497 2019;33:782–90.
- 498 46. Babbin BA, Parkos CA, Mandell KJ, Winfree LM, Laur O, Ivanov AI, et al. Annexin 2 regulates  
499 intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J*  
500 *Pathol*. 2007;170:951–66.
- 501 47. Kirshner J, Schumann D, Shively JE. CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly  
502 associates with annexin II in a three-dimensional model of mammary morphogenesis. *J Biol*  
503 *Chem*. 2003;278:50338–45.
- 504 48. Hopkins AM, Bruewer M, Brown GT, Pineda AA, Ha JJ, Winfree LM, et al. Epithelial cell  
505 spreading induced by hepatocyte growth factor influences paxillin protein synthesis and  
506 posttranslational modification. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:G886-898.
- 507 49. Tos M, Mogensen C. Pathogenesis of nasal polyps. *Rhinology*. 1977;15:87–95.
- 508

## 8. Synthèse et Discussion

Les effets de l'IL-6 sur l'épithélium nasal ont été démontrés par mes directeurs de thèse (Bequignon *et al.* 2020). Faisant suite à ces travaux, j'ai réalisé une étude sur l'IL-6 et une autre cytokine de la famille de l'IL-6, l'OSM, *in vitro*, sur le même modèle de culture primaire de CENH qu'ils avaient utilisé. Puis, nous avons réévalué l'effet de cytokines clés de l'inflammation T2, l'IL-4 et l'IL-13, pour lesquelles certaines fonctions comme la RETE, et la CMC avaient déjà été décrites mais dont les résultats disponibles dans la littérature manquaient de reproductibilité. Nous voulions surtout explorer l'effet direct du dupilumab sur l'épithélium nasal *in vitro* en présence et en l'absence d'un environnement inflammatoire caractérisé par une exposition des CENH de notre modèle de culture primaire à l'IL-4.

### **Quels sont les arguments en faveur du concept de dysrégulation épithéliale dans la PNS ?**

Dans les polypes nasaux, une barrière épithéliale défectueuse a été signalée, avec une diminution de la RETE et de l'expression des protéines JS (Soyka *et al.* 2012). Les résultats des expériences sur les CENH publiés par Wise *et al.* soutiennent le concept selon lequel l'épithélium des patients atteints de PNS est fait d'une barrière d'étanchéité inférieure à celle des sujets sains (Wise *et al.* 2014). Une rupture de la continuité épithéliale et de la membrane basale est l'une des nombreuses hypothèses qui sous-tendent la formation des polypes. Cependant, les mécanismes conduisant au dysfonctionnement des cellules épithéliales restent mal compris. Des facteurs extrinsèques peuvent servir de déclencheurs inflammatoires environnementaux (irritants ou particules inhalées, pneumallergènes, bactéries commensales et pathogènes), qui induisent le dysfonctionnement de la barrière épithéliale (Soyka *et al.* 2012; W. J. Fokkens *et al.* 2020; Carsuzaa *et al.* 2022; 2021; Thibaut Van Zele *et al.* 2004). Selon un concept pathogénique récent, le syndrome respiratoire aigu sévère est le résultat d'une réponse inflammatoire nasale chronique déclenchée par une perturbation de l'épithélium des voies respiratoires, quel que soit l'inducteur initial de l'agression (Kariyawasam 2019). Cet inducteur, tel que les champignons, les bactéries ou les lipopolysaccharides, pourrait augmenter l'expression de l'IL-6 et de l'OSM dans les polypes nasaux. L'augmentation de l'IL-6 et de l'OSM peut également être expliquée par une activité accrue des fibroblastes dépendant d'une inflammation locale chronique en cours, peut-être initiée par une infection (Pothoven *et al.* 2015; Carsuzaa *et al.* 2021).

### **L'OSM est-il une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la PNS ?**

Notre hypothèse était que parmi les cytokines inflammatoires impliquées dans les polypes nasaux, certaines de la famille des cytokines IL-6 (Stefan Rose-John 2018) pourraient altérer les mécanismes de réparation épithéliale. L'OSM contribue de façon critique à de nombreux processus physiologiques et pathologiques, notamment au remodelage de la MEC, à la différenciation cellulaire, à la réponse inflammatoire, et à la prolifération cellulaire (Masjedi *et al.* 2021; Tanaka et Miyajima 2003; Stephens et Elks 2017). On pouvait donc s'attendre à un effet similaire sur les CENH, même s'il n'a pas été décrit jusqu'à présent. Nous avons constaté qu'après stimulation par l'IL-6 ou l'OSM, seul l'OSM avait un effet sur la fonction de barrière épithéliale. En effet, l'OSM a diminué l'expression des protéines de JS, la RETE et la CMC. L'OSM a également induit un dysfonctionnement du mécanisme de réparation avec une augmentation de la vitesse de réparation épithéliale après blessures. L'OSM ayant un effet direct sur l'épithélium plus important que l'IL-6, il pourrait devenir une cible thérapeutique idéale. En revanche, bien que son récepteur soit présent à la surface des CENH et ses niveaux d'ARNm élevés au sein de polypes de patients atteints de PNS par rapport à des patients sains, la preuve de son implication dans la pathogénie de la PNS nécessite des études complémentaires. En effet, antagoniser cette cytokine à l'aide d'un AcM ne conduirait pas forcément à des effets épithéliaux bénéfiques. Ensuite, l'effet de l'OSM sur la prolifération ou la migration des CENH n'a pas été exploré. Outre la

prolifération des cellules épithéliales, l'OSM permettrait-elle la différenciation des cellules progénitrices pour restaurer les fonctions épithéliales altérées par les cytokines pro-inflammatoires ? Les résultats de l'OSM au niveau cutané étant très similaires aux nôtres au niveau nasosinusal, est-ce que ces résultats sont extrapolables au poumon ? à l'œsophage ? Une biothérapie ciblant directement l'OSM *in vivo* ferait-elle disparaître les symptômes de la PNS, de l'asthme, de la DA, ou de l'œsophagite à éosinophiles comme les autres biothérapies ? A ce stade, d'autres études pré-cliniques *in vitro* sont nécessaires, mais ces résultats sont déjà très prometteurs.

### **L'IL-4 et l'IL-13 ont-ils vraiment un effet direct sur l'épithélium dans la PNS ?**

Les présents résultats montrent une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-4 et de l'IL-13 et une réduction de l'expression protéique de l'occludine dans les polypes nasaux. Après stimulation, l'IL-4, mais pas l'IL-13, a eu un effet significatif sur les fonctions épithéliales : diminution de l'expression de ZO-1 et d'occludine, de la RETE, de la CMC et de la vitesse de réparation. Dans ce travail, l'IL-13, n'a eu aucun effet sur les CENH. Ces résultats, cohérents avec ceux de Wise *et al.* qui ont étudié la RETE (Wise *et al.* 2014), diffèrent de ceux sur la FBC et les JS de Laoukili *et al.* (Laoukili *et al.* 2001). Comme les altérations des protéines de JS sont directement corrélées à la migration cellulaire et à la cicatrisation épithéliale (Babbin *et al.* 2007; Kirshner, Schumann, et Shively 2003; A. M. Hopkins *et al.* 2004), nous nous attendions à un effet de l'IL-4 mais pas de l'IL-13. Alors qu'elles partagent des similitudes structurales et un récepteur commun (IL-4RII), nous avons mis en évidence une différence fonctionnelle importante entre IL-4 et IL-13. Cela est probablement lié aux multiples voies de signalisation qui sont activées en aval du récepteur de ces cytokines et d'un effet de compétition qu'il serait intéressant d'explorer. L'IL-4 semble jouer un rôle majeur sur l'épithélium, en plus de ses effets connus de régulateur de la différenciation des LT2 et sur la commutation isotypique des IgG1 vers les IgE (Y. Zhang *et al.* 2019), tandis que l'IL-13 semble uniquement jouer un rôle sur la production de mucus par les CENH mais sans effet sur les fonctions épithéliales de barrière, de CMC ou de réparation.

### **Le dupilumab a-t-il un effet bénéfique sur l'épithélium altéré par l'inflammation T2 ?**

Nous avons choisi d'étudier l'effet direct du dupilumab sur l'épithélium nasal *in vitro* car c'est la première biothérapie à avoir eu l'AMM en France dans la PNS seule. Aucun effet négatif du dupilumab n'a été identifié *in vitro*. Ainsi, aujourd'hui, aucun frein au développement d'une éventuelle administration nasale de biothérapies n'a été identifié. Dans les polypes nasaux, une barrière épithéliale défectueuse a été rapportée avec une diminution de la RETE et une diminution de l'expression des protéines de JS (Soyka *et al.* 2012). La rupture de la continuité épithéliale est l'une des nombreuses hypothèses qui sous-tendent la pathogenèse de la PNS depuis 1977 (Tos et Mogensen 1977). Par conséquent, la restauration de l'intégrité de la barrière épithéliale après des agressions environnementales serait un élément clé pour améliorer les capacités de défense de l'épithélium respiratoire. Dans ce travail, la présence de dupilumab a restauré toutes les fonctions épithéliales étudiées et altérées par une stimulation inflammatoire T2 via une exposition *in vitro* à des doses croissantes d'IL-4. Pour les études futures, la mesure des effets *in vivo* du dupilumab sur les fonctions épithéliales pourrait être d'un grand intérêt pour améliorer notre connaissance de cette biothérapie et nous permettre de choisir les traitements appropriés.

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

Notre travail a suggéré une nouvelle cible thérapeutique, l'OSM dans la course au développement des biothérapies ciblant l'inflammation, mais aucune molécule anti-OSM n'est actuellement à l'étude au sein d'ECR de phase 2 ou 3. Ensuite, si la sécurité et l'efficacité du dupilumab étaient prouvées *in vivo* au sein de l'épithélium nasal, nous sommes convaincus que l'utilisation de la voie nasale pourrait considérablement transformer l'efficacité du traitement, simplifier son administration, et réduire ses effets secondaires systémiques par un effet local immédiat améliorant considérablement la qualité de vie des patients. Des études précliniques supplémentaires sont nécessaires pour :

- i) Confirmer les effets de l'OSM sur l'épithélium nasal
- ii) Evaluer l'effet d'anti-OSM sur les fonctions épithéliales
- iii) Evaluer l'administration nasale de dupilumab
- iv) Evaluer l'effet du mépolizumab *in vitro* sur les CENH

## Axe 3 :

Evaluation *in vivo* de l'efficacité de  
l'administration nasale d'une biothérapie  
utilisée dans le traitement de l'Hémophilie B



# 1. Introduction

L'hémophilie A (HA) et B (HB) sont des maladies hémorragiques récessives rares, liées au chromosome X, caractérisées respectivement par un déficit en facteur VIII (FVIII) ou FIX (Mancuso, Mahlangu, et Pipe 2021). Un rappel sera réalisé sur les étapes nécessaires à la formation du clou plaquettaire et sa résorption, c'est-à-dire, l'hémostase primaire, secondaire et la fibrinolyse. Pour la suite de ce travail de recherche, l'exemple de l'HB sera choisi car c'est le modèle d'étude qui été retenu pour répondre à l'objectif fixé pour cet Axe 3 : évaluer l'efficacité d'une nouvelle voie d'administration nasale non invasive *in vivo* dans le traitement de l'HB. La sévérité de l'hémophilie dépend de la quantité de FIX présent dans le sang et de l'activité de ce dernier (FIX :C). L'HB sévère est caractérisée par un niveau d'activité du FIX < 1UI/dl et elle se manifeste par des épisodes hémorragiques spontanés et prolongés qui se produisent principalement dans les articulations mais qui peuvent également mettre en jeu le pronostic vital, notamment en cas d'hémorragie intracrânienne (Bolton-Maggs et Pasi 2003). Le traitement standard actuel de l'HB sévère est la prophylaxie, qui consiste en des perfusions IV plusieurs fois par semaines ou par mois de FIX recombinant (nonacog alfa, rFIX). Ces molécules ont une demi-vie assez courte, mais des modifications qui seront décrites au sein d'un chapitre dédié (chapitre 2.3.2.) ont été développées et il existe aujourd'hui du rFIX à demi-vie prolongée (EHL-rFIX, pour Extended Half Life-rFIX) (Nederlof *et al.* 2020; Arya *et al.* 2022). Bien qu'efficaces, ces perfusions IV régulières à long terme nuisent considérablement à la qualité de vie des patients et des soignants (Arya *et al.* 2022; Perot *et al.* 2015). Il reste donc un besoin non satisfait en ce qui concerne le développement d'une voie non invasive pour l'administration de facteurs de coagulation, en particulier pour les nouveau-nés qui présentent un risque d'hémorragie intracrânienne et pour les patients pédiatriques dont l'accès veineux est difficile (Zanon *et al.* 2022).

En 2012, Samson *et al.* observent le passage de Bevacizumab (Avastin® ; Roche, Bâle, Suisse) à travers de la muqueuse porcine (Samson *et al.* 2012) ouvrant la voie à l'administration intranasale (IN) de biothérapies. Par la suite, l'administration IN a prouvé qu'elle permettait de délivrer des concentrations thérapeutiquement pertinentes de nombreuses substances différentes, y compris des produits biologiques de grande taille (Heni *et al.* 2014; Brambilla *et al.* 2016; An *et al.* 2021; S. Chung *et al.* 2023). En outre, l'administration IN pourrait être le choix privilégié par rapport à l'administration orale de produits biologiques, car elle présente des avantages potentiels : auto-administrations et ajustement de la dose faciles, apparition rapide des effets, absence d'élimination hépatique de premier passage, absence de pH extrêmement bas et d'enzymes digestives dans le tractus gastro-intestinal (Bern *et al.* 2020), et voies directes potentielles vers le système nerveux central (SNC) qui contournent la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Kumar *et al.* 2018). Chez l'Homme, il a été démontré que l'administration IN d'insuline avait un effet positif sur la mémoire et les effets métaboliques par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Benedict *et al.* 2007; 2004; 2011; Heni *et al.* 2014; Kullmann *et al.* 2013).

Le FcRn a été découvert dans les années 1980 (Simister et Mostov 1989) et un rappel sur ses caractéristiques structurales et ses fonctions sera fait. Brièvement, il s'agit d'un transporteur et d'un protecteur des IgG, ubiquitaire, qui joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie immunitaire chez l'adulte (Wani *et al.* 2006; Lobo, Hansen, et Balthasar 2004). Il a également un impact sur la biodistribution des AcM à travers la barrière cellulaire (Roopenian et Akilesh 2007). Ainsi, les FcRn sont de potentiels vecteurs pour l'administration chez l'Homme de biothérapies (Ac thérapeutiques ou autres produits biologiques) au travers des muqueuses (Ward, Devanaboyina, et Ober 2015). Cependant, bien que le rôle du FcRn a été caractérisé dans les voies aériennes inférieures au début des années 2000 (Low *et al.* 2005a; Bitonti *et al.* 2004; 2006; Dumont *et al.* 2005), les données dans les voies aériennes supérieures sont uniquement préliminaires (Heidl *et al.* 2016; Bequignon *et al.* 2019). Le transport de biothérapies par voie nasale a été prouvé avec de l'infliximab *in vitro* (Bequignon *et al.* 2019), mais les caractéristiques fonctionnelles de la molécule transcytosée n'ont pas été étudiées.

A ce stade, des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier le rôle du FcRn dans l'administration IN de facteurs de la coagulation. Deux produits EHL-rFIX, génétiquement fusionnés au fragment Fc d'une IgG (Eftrenonacog alfa, rFIX-Fc) ou à l'albumine mature (Albutreponacog alfa, rFIX-Alb) (Shapiro *et al.* 2012 ; Santagostino *et al.* 2012), ont démontré une demi-vie prolongée grâce à la liaison au FcRn (R. T. Peters *et al.* 2010; Chia *et al.* 2018) mais leur passage transmuqueux n'a jamais été évalué. En outre, les modalités d'administration de ces biothérapies et leurs capacités fonctionnelles une fois délivrées dans la circulation sanguine sont des éléments clés conditionnant le développement de la voie nasale. Par exemple, la génération de gouttes d'aérosol de la taille d'un micron peut avoir des effets considérables sur les protéines. La contrainte de cisaillement qui se produit pendant la formation de l'aérosol peut induire la formation de protéines non pliées ou l'agrégation des protéines (Guilleminault *et al.* 2014; Engelhardt *et al.* 2016; Möller *et al.* 2014; Coates 2008; Lochhead et Thorne 2012), ce qui entraîne une diminution de l'efficacité biologique et des effets secondaires immunitaires (Kumar *et al.* 2018). Il est donc très important, une fois la preuve de concept du passage transmuqueux réalisée, d'étudier de façon approfondie le comportement des produits biologiques après leur administration IN.

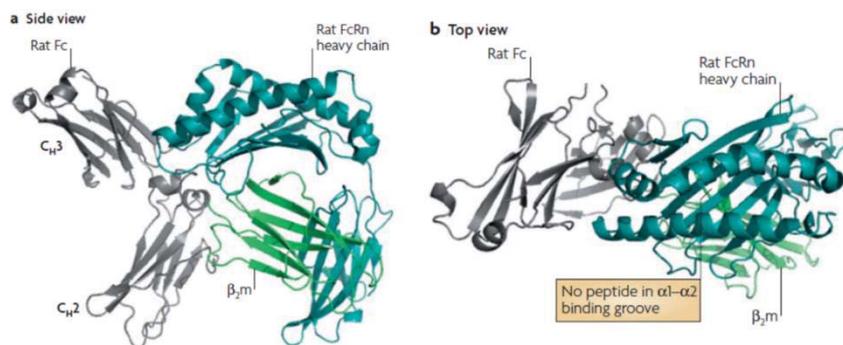
L'objectif était d'évaluer l'efficacité d'une nouvelle voie d'administration nasale non invasive *in vivo* en prenant l'exemple du rFIX-Fc, une biothérapie de demi-vie allongée grâce à une liaison au Fc des IgG, utilisée dans le traitement de l'HB.

## 2. Rappels : FcRn, Hémostase et Hémophilie B

### 2.1. Le récepteur néonatal au fragment Fc des Ig (FcRn)

#### 2.1.1. Structure et localisation

Le FcRn est un hétérodimère de la famille des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) cloné depuis les années 80 (**Figure 44**). Il est composé d'une chaîne lourde  $\alpha$  et d'une chaîne légère de  $\beta_2$  microglobuline (obligatoire pour toutes les molécules de CMH-1) (Simister et Mostov 1989). Il a été étudié initialement comme transporteur des IgG maternelles vers le fœtus, puis son rôle dans l'homéostasie des IgG sériques chez l'adulte a été observé (Ghetie et Ward 1997; Junghans et Anderson 1996; Wani *et al.* 2006). Il se fixe au fragment cristallisable (Fc) des IgG

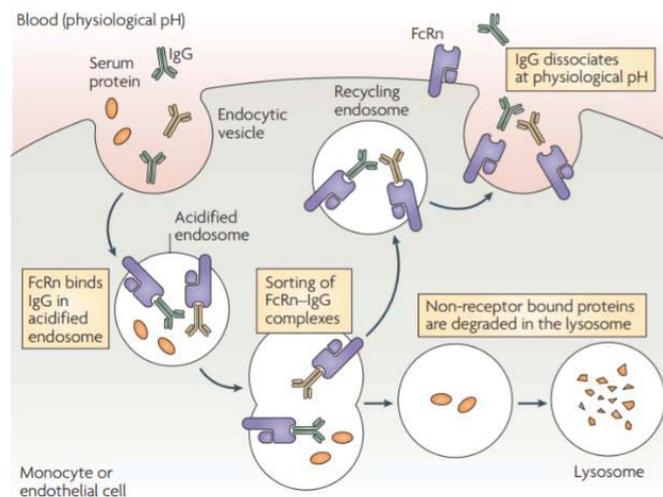


**Figure 44. Structure du FcRn de rat (structure de type CMH-1)**

Le FcRn est composé d'une chaîne lourde de type CMH-1 (en turquoise) et d'une chaîne légère de  $\beta_2$ -microglobuline (en vert). Le FcRn ne lie pas les peptides, habituellement reconnus au niveau du sillon  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  (b). Au lieu de cela, le FcRn se lie aux régions charnières CH2-CH3 dans la région Fc des IgG (en gris).

Source : (Roopenian et Akilesh 2007)

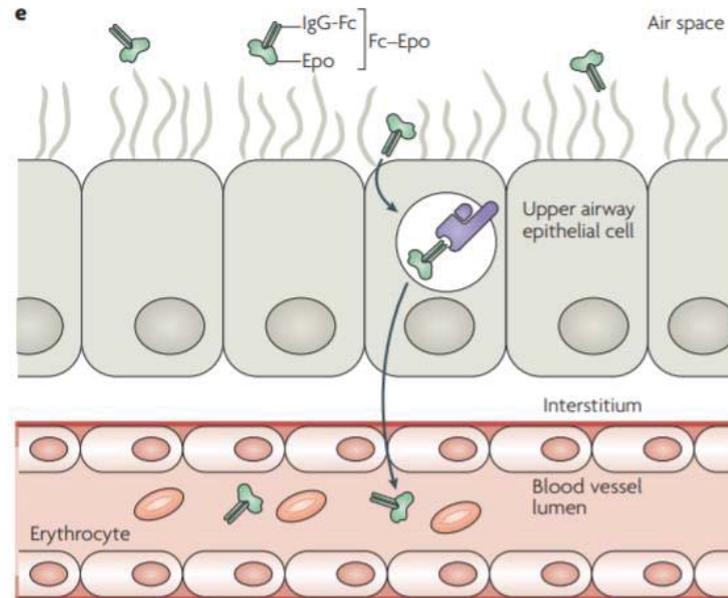
Le FcRn est situé à la surface de nombreuses cellules dont les cellules endothéliales vasculaires où il protège les IgG de la dégradation (**Figure 45**).



**Figure 45. Représentation schématique de la protection des IgG par le FcRn via une endocytose**

Source : (Roopenian et Akilesh 2007)

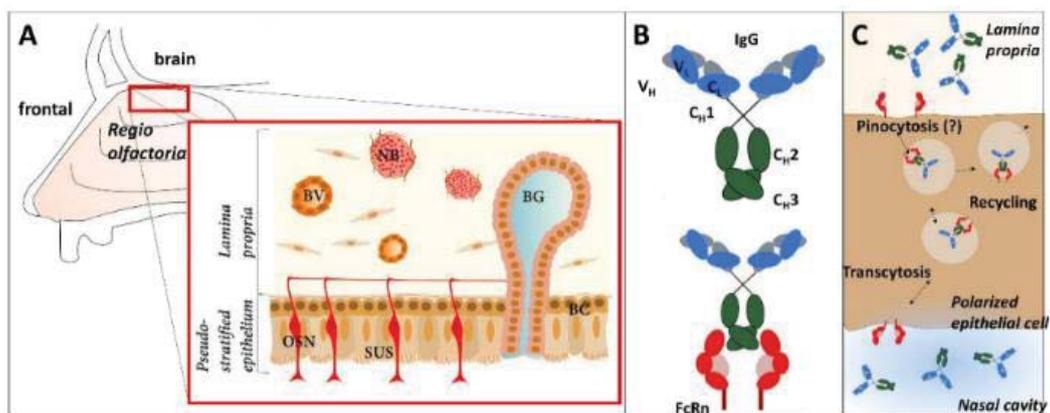
Le FcRn est également situé à la surface des cellules épithéliales des voies aériennes où il permet la transcytose d'anticorps couplés à des protéines (**Figure 46 et 47**).



**Figure 46. Représentation schématique de la transcytose d'IgG grâce au FcRn**

Chez l'Homme et les primates non humains, le FcRn est exprimé par les cellules épithéliales des voies aériennes supérieures et peut transporter des médicaments couplés au Fc, tels que l'érythropoïétine, à travers l'épithélium jusqu'au sang.

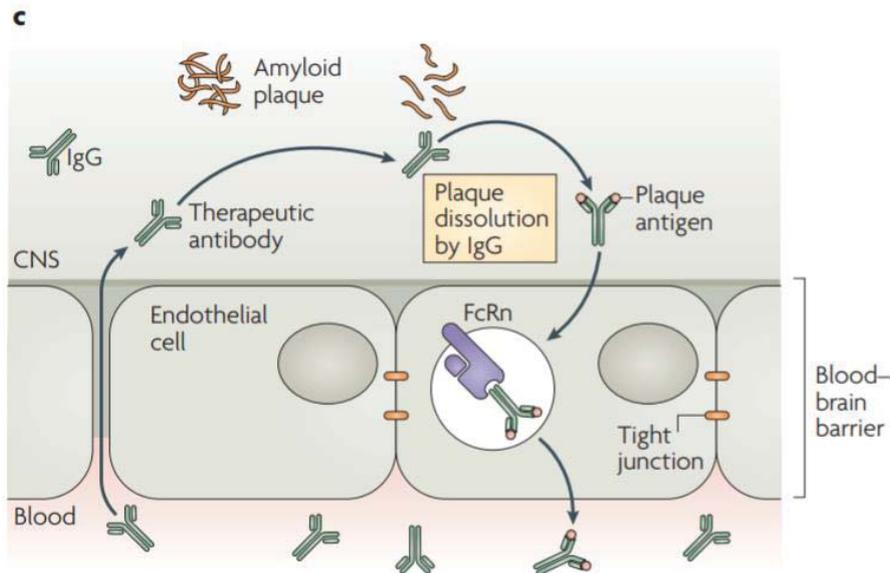
Source : (Roopenian et Akilesh 2007)



**Figure 47. Rôle du FcRn au niveau de l'épithélium nasal**

(A) La muqueuse olfactive de mammifères est composée d'un épithélium pseudostratifié qui contient des neurones olfactifs, des cellules de soutien et des cellules basales. L'épithélium olfactif est délimité par un tissu conjonctif épais appelé la lamina propria qui contient les glandes de Bowman, les vaisseaux sanguins, et les filets olfactifs. (B) Structure d'une IgG et de sa liaison au FcRn. (C) L'IgG est incorporée au sein des cellules au pôle apical par un mécanisme de pinocytose. Le FcRn se lie au fragment Fc de l'IgG à pH acide au sein des endosomes et médie ainsi la transcytose vers le pôle basal. L'exemple représenté ici se fait depuis la cavité nasale vers le pôle basal. Source : (Heidl et al. 2016)

Le FcRn situé à la surface des cellules de la barrière hématoencéphalique permet de transporter les IgG présentes dans le LCR directement vers la circulation à partir d'un mécanisme de transcytose inversé (**Figure 48**). Mais il a été aussi décrit comme un moyen d'accès direct au système nerveux central après administration nasale, le passage de molécules se ferait ainsi dans les deux sens (Lochhead et Thorne 2012; Dhuria, Hanson, et Frey 2010).



**Figure 48. Transcytose inversée au niveau de la barrière hémato-encéphalique**

Le FcRn est également situé dans les cellules endothéliales vasculaires du système nerveux central (SNC). Les anticorps thérapeutiques ciblant le SNC et délivrés par voie systémique peuvent traverser par voie paracellulaire. Une fois dans le SNC, ces anticorps se lient aux dépôts de plaques amyloïdes et les dissolvent. Ensuite, le FcRn assure un transport des anticorps liés à la plaque amyloïde de nouveau à travers la barrière hémato-encéphalique vers la circulation systémique, réduisant ainsi le risque de surcharge amyloïde dans le SNC.

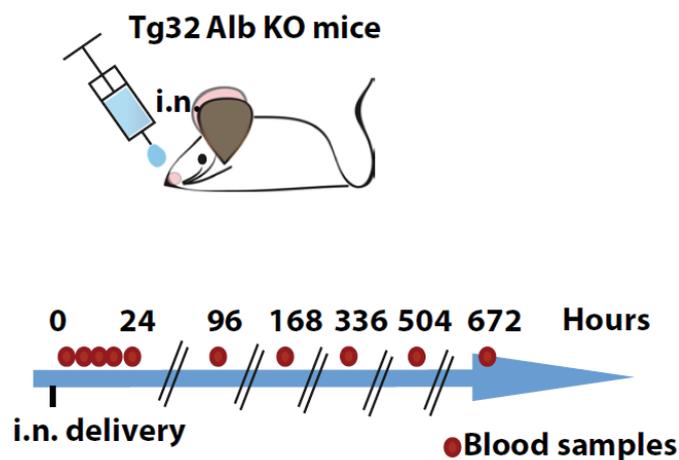
Source : (Roopenian et Akilesh 2007)

### 2.1.2. Interaction entre le FcRn et les IgG

Le FcRn se lie à la région Fc de l'IgG au niveau de sa zone charnière CH2-CH3 (site distinct des sites de liaison des FcγRs classiques ou de la voie classique d'activation du complément) (Burmeister, Huber, et Bjorkman 1994; Martin *et al.* 2001; Idusogie *et al.* 2000). Le FcRn ne lie pas les IgM, ni les IgA, ni les IgE. A l'inverse, la région Fc des IgG est une région polyvalente qui peut lier aussi la protéine staphylococcique A, streptococcique G et le facteur rhumatoïde (Corper *et al.* 1997; Deisenhofer 1981; Derrick et Wigley 1992). Contrairement aux récepteurs Fc conventionnels des IgG (les FcγRs), la liaison FcRn-Fc est pH dépendante (P. Raghavan, Mukherjee, et Phillips 2009 ; Chaudhury *et al.* 2003). Après une endocytose non spécifique, l'IgG se lie au FcRn dans les endosomes à pH acide (pH 6-6,5), et le complexe FcRn-IgG est recyclé puis transféré vers la membrane cellulaire pour être relargué dans le milieu extracellulaire (pH 7,4). La liaison FcRn-ligand à pH acide permet de protéger l'IgG de la dégradation et contribue donc à l'allongement de la demi-vie de l'IgG sérique (Datta-Mannan *et al.* 2007). Le FcRn ne subit pas de changement de conformation majeur lorsqu'il se lie à l'IgG (Vaughn et Bjorkman 1998). Au contraire, la forte dépendance au pH de l'interaction FcRn-Fc dépend de l'histidine de la région charnière CH2-CH3 de l'IgG et de leurs interactions avec les a.a. à la surface du FcRn. Il est important de noter que lorsque les résidus histidine de l'IgG aux positions 310 et 435 sont mutés en alanine, la liaison de l'IgG au FcRn est fortement réduite ou abrogée (Medesan *et al.* 1997; J. K. Kim *et al.* 1999; Firan *et al.* 2001; Shields *et al.* 2001; Petkova *et al.* 2006; Raghavan *et al.* 1995; J. K. Kim *et al.* 1994).

L'analyse cristallographique du FcRn de rat complexé avec le Fc a révélé qu'il existe deux conformations structurales pour le complexe FcRn-Fc, une symétrique et une asymétrique (Burmeister, Huber, et Bjorkman 1994). En effet, le fragment Fc possède deux sites de liaison pour le FcRn (étant un homodimère de deux chaînes lourdes). Soit, les deux molécules de FcRn se lient symétriquement à une région charnière du Fc ce qui réduit l'avidité de liaison globale pour le FcRn et diminue la transcytose et la demi-vie *in vivo* de la molécule hétérodimérique de Fc (J. K. Kim *et al.* 1994; Tesar, Tiangco, et Bjorkman 2006). Soit, les deux molécules de FcRn entrent en contact avec l'IgG de manière asymétrique. L'un des récepteurs domine l'interaction avec le Fc, mais l'autre molécule de FcRn contribue à stabiliser le complexe. La dimérisation des FcRn n'est pas nécessaire pour lier le Fc de cette manière, mais cela augmente l'affinité de l'interaction (Raghavan *et al.* 1995; Vaughn *et al.* 1997). En effet, la dimérisation du FcRn dans les structures cristallines n'a été observée que pour le FcRn des rongeurs et dépend de la glycosylation de la chaîne lourde du FcRn (Vaughn et Bjorkman 1998). Bien que cette dimérisation du FcRn humain n'ait pas été observée dans les cristaux, le récepteur se dimérise toujours lorsqu'il est immobilisé sur une membrane (Praetor *et al.* 2002). Ainsi, deux molécules de FcRn se lient de manière asymétrique à une seule région Fc d'une molécule d'IgG. Cependant, les deux régions Fc d'une molécule d'IgG doivent être capables de se lier au FcRn pour que le transport et le recyclage soient efficaces.

La conception de nouvelles biothérapies visant à augmenter ou à diminuer la demi-vie des IgG *in vivo* nécessite une validation préclinique avant d'être testée chez l'Homme. Bien que les primates soient les plus susceptibles de reproduire les paramètres PKs humains, pour respecter l'éthique de l'expérimentation chez l'animal, c'est-à-dire les 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement), il est souhaitable d'évaluer les paramètres PKs et PDs sur des modèles murins. Malheureusement, des différences existent entre modèles murins et humains ce qui peut influencer l'évaluation de nouveaux traitements ciblant le FcRn (Vaccaro *et al.* 2006). Premièrement, des différences concernant l'expression du FcRn. Ensuite, les FcRn de la souris ont des affinités de liaison différentes pour les IgG selon les espèces (Ober *et al.* 2001) : le FcRn humain ne se lie qu'aux IgG humaines, de cobaye et de lapin, alors que le FcRn murin se lie aux IgG de nombreuses espèces avec une grande affinité. Pour pallier ces différences, des modèles murins transgéniques knock-out (KO) pour le FcRn murin (mFcRn) mais exprimant le FcRn humain (hFcRn) ont été générés. Ils s'avèrent être le meilleur modèle « translationnel » pour l'évaluation des biothérapies ciblant le FcRn (Roopenian *et al.* 2003). Ce modèle s'avère utile pour étudier la localisation de l'expression de l'hFcRn et l'interaction entre biothérapies et hFcRn *in vivo* (Figure 49) (Yoshida *et al.* 2004; Bern *et al.* 2020).



**Figure 49.** Représentation schématique d'une souris transgénique pour le FcRn avec le schéma d'administration des biothérapies et des prélèvements sanguins réalisées

Source : (Bern *et al.* 2020)

Comme la  $\beta 2m$  entre également en contact avec le Fc, une amélioration de ce modèle pourrait consister à introduire un transgène codant pour la  $\beta 2m$  humaine en plus (Yoshida *et al.* 2004). Au total, malgré quelques limitations (effet concentration-catabolisme, faible taux sérique d'IgG), ce modèle transgénique FcRn humain est à ce jour le meilleur modèle animal pour évaluer les biothérapies ciblant le FcRn et c'est celui qui a été choisi pour étudier la transcytose de rFIX *in vivo* dans le cadre de ce travail de recherche. Bien évidemment, il s'agit d'études preuve de concepts, qui sont préliminaires à la validation PK au sein de modèles primates puis chez l'Homme.

### 2.1.3. Rôle du FcRn et implication thérapeutique

Le FcRn est avant tout un transporteur des immunoglobulines G (IgG) maternelles vers le fœtus au cours de la grossesse (Rodewald et Abrahamson 1982; Rodewald et Kraehenbuhl 1984; Simister et Rees 1985). Rapidement, le FcRn a été reconnu comme ubiquitaire et exprimé tout au long de la vie par l'Homme, y compris à l'âge adulte (Rath *et al.* 2013; Roopenian et Akilesh 2007; Ward et Ober 2009; Bequignon *et al.* 2019; Heidl *et al.* 2016). Il joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie immunitaire chez l'adulte et dans la régulation de la demi-vie des IgG en les protégeant de la dégradation grâce à un mécanisme de recyclage (Wani *et al.* 2006; Lobo, Hansen, et Balthasar 2004). Il joue aussi un rôle dans la libération d'IgG à travers les muqueuses pour conférer une immunité protectrice (Rawool *et al.* 2008; L. Lu *et al.* 2011; Ye *et al.* 2011; Ko *et al.* 2014; Z. Li *et al.* 2011; Yoshida *et al.* 2006). Il régule également l'homéostasie de l'albumine (Chaudhury *et al.* 2003) et il convient de noter que le site de liaison de l'albumine sur le FcRn est différent de celui de l'IgG (Andersen, Dee Qian, et Sandlie 2006; Oganessian *et al.* 2014) ; ils ne sont donc pas en concurrence pour la liaison avec le FcRn. Une synthèse du FcRn, de ses sites de liaisons, et de son activité pH dépendante est présentée **Figure 50**.

Enfin, le FcRn a un impact sur la biodistribution des AcM de type IgG ; il transporte les anticorps à travers la barrière cellulaire qu'ils soient endogènes ou thérapeutiques (Rath *et al.* 2013; Roopenian et Akilesh 2007; Ward et Ober 2009; Spiekermann *et al.* 2002; Bitonti *et al.* 2004; Lobo, Hansen, et Balthasar 2004; Nissim et Chernajovsky 2008; Claypool *et al.* 2004; Dickinson *et al.* 1999; Firan *et al.* 2001; McCarthy, Yoong, et Simister 2000; Bern *et al.* 2020; Bequignon *et al.* 2019). En intervenant ainsi dans la transcytose des biothérapies et en empêchant leur dégradation, le FcRn est devenu un élément clef du développement des voies d'administrations non invasives (Lobo, Hansen, et Balthasar 2004 ; Nissim et Chernajovsky 2008). Le détail des stratégies thérapeutiques développées autour du FcRn apparaissent dans le **tableau 7**.

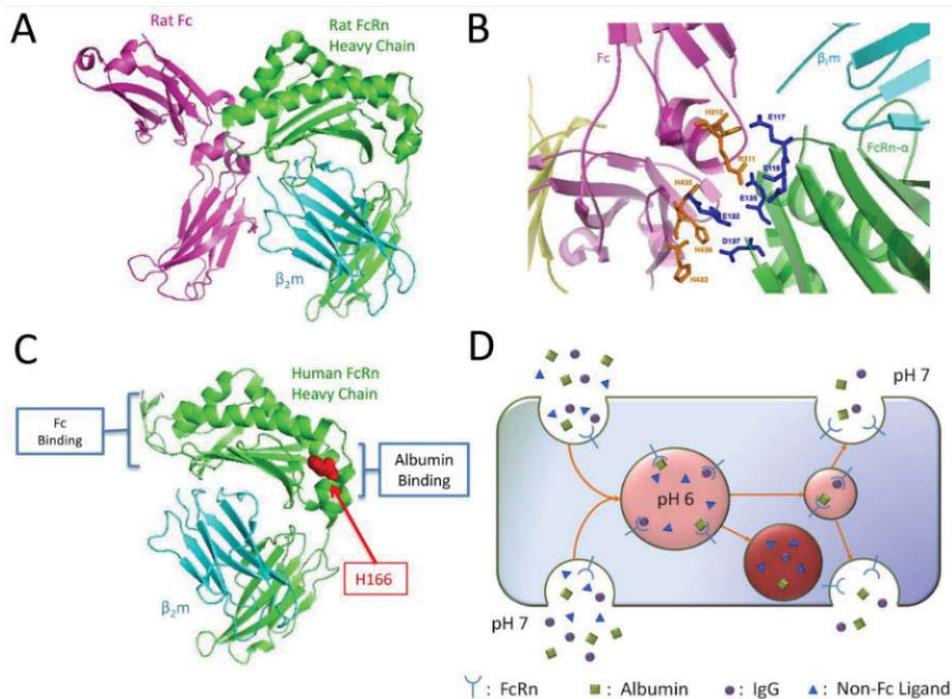
L'intérêt de moduler la liaison FcRn-Fc des Ig est multiple. Dans l'hypothèse d'une extension de la demi-vie des AcM, cela permet de : i/ minimiser les effets indésirables causés par des doses élevées en améliorant le recyclage ; ii/ réduire la fréquence des injections en augmentant la demi-vie ; iii/ maximiser la transcytose vers des sites spécifiques en améliorant l'effet tissulaire et en diminuant les effets secondaires systémiques ; iv/ améliorer l'efficacité de l'administration transplacentaire ; et, v/ diminuer les coûts de production. A l'inverse, raccourcir la demi-vie d'un AcM, permet de : i/ assurer une élimination rapide des anticorps utilisés pour l'imagerie et/ou la radioimmunothérapie ; ii/ favoriser l'élimination des anticorps pathogènes endogènes dans le traitement des maladies auto-immunes ; et, iii/ réduire le risque d'une issue défavorable de la grossesse causée par le transport transplacentaire d'Ac maternels spécifiques au fœtus.

Stratégie thérapeutique	Effets	Maladies	Références
Ig à haute en dose en IV	Augmentation de l'élimination des IgG par saturation du FcRn	Thrombocytopénie	(N. Li <i>et al.</i> 2005; Hansen et Balthasar 2002b; 2002a)
AcM anti $\beta_2m$ (chaîne légère obligatoire du FcRn)	Augmentation de l'élimination des IgG par blocage de la liaison FcRn-Fc	Maladies auto-immunes	(Getman et Balthasar 2005)
AcM anti-FcRn	Augmentation de l'élimination des IgG par blocage de la liaison FcRn-Fc	Myasthénie	(L. Liu <i>et al.</i> 2007)
Ac avec affinité accrue pour le FcRn au niveau de sa région Fc	Augmentation de l'élimination des IgG en raison d'une affinité supérieure à celles des IgG endogènes pour la liaison au FcRn	Maladies auto-immunes	(Petkova <i>et al.</i> 2006; Vaccaro <i>et al.</i> 2005)
AcM murin humanisé pour le FcRn	Amélioration de la liaison AcM-hFcRn par rapport au FcRn murin	NA	(Roopenian <i>et al.</i> 2003; Ober <i>et al.</i> 2001)
Antigène 4 des LT cytototoxiques	Augmentation de la demi-vie liée à la région Fc de l'IgG	NA	(Roopenian <i>et al.</i> 2003)
Fc-EPO, Fc-FSH	Délivrance au travers de l'épithélium respiratoire ; amélioration de la demi-vie liée à la région Fc de l'IgG	Anémie, Déficit hormonal	(Spiekermann <i>et al.</i> 2002; Bitonti <i>et al.</i> 2004; Dumont <i>et al.</i> 2005; Low <i>et al.</i> 2005b)
Ac anti-amyloïde	Augmentation de l'efflux de complexe Ac-Plaqué Amyloïde depuis le SNC avec diminution de l'accumulation amyloïde.	Alzheimer	(Deane <i>et al.</i> 2005)

**Tableau 7. Effets des stratégies thérapeutiques impliquant le FcRn testées sur modèles murins**

Les résultats sont issus de travaux *in vivo* sur modèles murins, mais Bitonti *et al.* ont également mis en évidence chez des sujets sains volontaires le passage de Fc-EPO.

Source : (Roopenian et Akilesh 2007)



**Figure 50. Synthèse du FcRn, de ses sites de liaisons et de son activité pH dépendante**

Source : (Roopenian et Sun 2010)

## 2.2. L'hémophilie

### 2.2.1. Définition et épidémiologie

L'hémophilie A (HA) et l'hémophilie B (HB) sont des maladies hémorragiques constitutionnelles, caractérisées par un déficit en facteur de la coagulation, le FVIII pour l'HA et le FIX pour l'HB. Ces déficits sont dus à des mutations du gène F8 (Xq28) pour l'HA et du gène F9 (Xq27) pour l'HB. La transmission de ces pathologies est récessive et liée à l'X. Les hommes sont atteints et les femmes sont conductrices (Bolton-Maggs et Pasi 2003). Il existe cependant des femmes dont les taux de facteurs sont à des niveaux insuffisants et elles peuvent être symptomatiques.

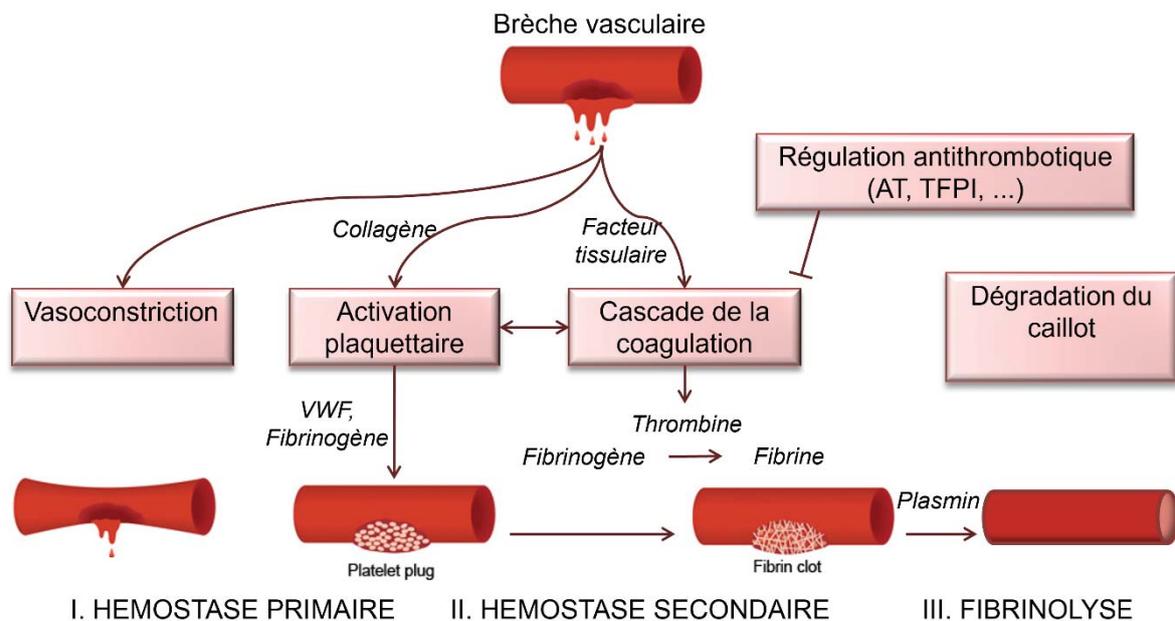
L'hémophilie est une maladie rare et sous-diagnostiquée, 75% des patients vivant avec l'hémophilie dans le monde n'ont pas été diagnostiqués à ce jour. La prévalence estimée varie de 100 à 160 par million d'habitants mâles. Il existerait plus de 429 232 patients qui souffriraient d'un trouble de la coagulation dans le monde dont 256 840 malades hémophiles (HA et HB confondues). D'après le dernier rapport annuel de 2021 de la World Federation of Hemophilia (WHF), ont été répertoriés 185 318 HA et 37 998 HB, dans 118 pays (80% de répondeur) (Semienchuk 2022). Ainsi l'HA est 5 à 6 fois plus fréquente que l'HB. Selon les données répertoriées en 2023 en France par le registre FranceCoag, 5781 patients sont atteints d'HA dont 32% de forme sévère (FVIII :C <1UI/dL), et 1305 patients sont atteints d'HB dont 28% de forme sévère (FIX :C <1UI/dL) (MHEMO 2017). Les rappels sur l'hémophilie, l'hémostase et les symptômes sont issus des recommandations sur la prise en charge de l'hémophilie rédigées par Srivastava *et al.* (Srivastava *et al.* 2013) et également du protocole national de soins de la HAS concernant l'hémophilie (Haute Autorité de Santé 2019) et des supports mis à disposition pour le diplôme d'études supérieures d'hémostase destiné aux hématologues biologistes.

### 2.2.2. Rappels sur l'hémostase

L'hémostase se définit par un ensemble de processus physiologiques qui permet de maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins. Ces mécanismes sont sollicités lors de l'apparition d'une brèche vasculaire et conduisent à la formation d'un caillot sanguin composé de plaquettes et de fibrine qui maintient les cellules sanguines dans son maillage. Bien qu'elles soient initiées simultanément, ce processus est classiquement divisé en trois phases : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse (Srivastava *et al.* 2013). Seuls quelques éléments clefs sont détaillés dans le chapitre suivant, mais un rappel synthétique du processus est présenté en annexe (**Annexe 13**).

### a. L'hémostase primaire

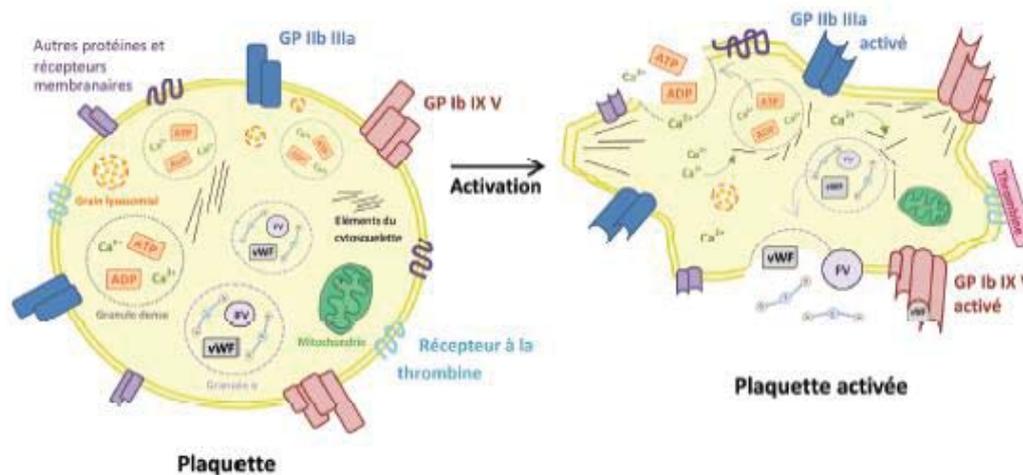
Le processus d'hémostase primaire se met en jeu dès qu'une brèche vasculaire se constitue, impliquant plusieurs types de cellules, les cellules endothéliales vasculaires, le sous endothélium et les plaquettes, ainsi que des protéines plasmatiques telles que le facteur de Von Willebrand (FvW) et le fibrinogène (Fbg). L'hémostase primaire ferme la brèche vasculaire grâce à la formation du clou plaquettaire, selon un processus décrit en trois temps (**Figure 51**).



**Figure 51. Représentation schématique de l'hémostase primaire, secondaire et de la fibrinolyse**  
 L'hémostase primaire ralentit le flux sanguin par vasoconstriction et met en jeu les plaquettes et le sous endothélium afin de colmater la brèche vasculaire par la formation d'un clou plaquettaire. La coagulation consolide le thrombus plaquettaire en constituant un réseau de fibrine insoluble, formant ainsi un caillot sanguin. La fibrinolyse qui dégrade ultérieurement le caillot au fur et à mesure que la paroi vasculaire se réimperméabilise. Abréviations: AT, Antithrombin; TFPI, tissue factor pathway inhibitor  
 Source : archives du Dr. Sandra Le Quellec, MCU-PH, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL

### b. La coagulation

La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques réalisées par des facteurs de la coagulation, survenant à la surface des PLs membranaires des plaquettes activées (**Figure 52**), des cellules endothéliales ou des monocytes et qui aboutissent à la formation de thrombine. Cette enzyme clé transforme le Fbg en Fibrine (Fbn) constituant le caillot sanguin. Classiquement, le phénomène de coagulation était décrit selon 3 voies d'activation. Ce concept est utile pour l'interprétation de son exploration biologique *in vitro*, mais reflète peu le déroulement physiologique de l'hémostase *in vivo*. Avant de détailler le processus de coagulation, rappelons ci-dessous les principaux facteurs de la coagulation et leurs caractéristiques.



**Figure 52. Représentation schématique d'une plaquette et de ses principaux constituants**

Représentation schématique d'une plaquette et de son changement de conformation, y compris le flip-flop membranaire secondaire à son activation qui joue un rôle majeur en exposant les PLs membranaires.

Abréviations : GP, glycoprotéine ; ATP, Adénosine Triphosphate ; vWF, Facteur de von Willebrand ; FV, Facteur V

Source : Archives du Dr Emilie Perrot, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL

Les facteurs de la coagulation sont essentiellement synthétisés par les hépatocytes sous forme de proenzymes. Les facteurs II, VII, IX et X possèdent des domaines riches en résidus  $\gamma$ -carboxylés, indispensables à la fixation de ces facteurs à la surface des plaquettes activées (Tableau 7). Le cofacteur de la  $\gamma$ -carboxylase est la vitamine K réduite  $KH_2$ , ce qui explique que la synthèse des facteurs précédemment mentionnés soit vitamine K dépendante (Presnell et Stafford 2002).

Facteurs	Fonction	Synthèse	Demi-vie	Concentration plasmatique ( $\mu\text{g/ml}$ )	Poids (kDa)
Fibrinogène	Formation du caillot		4-6jours	3000	330
Prothrombine	Fibrinoformation Activation du FV, FVIII, FXI, FXIII, protéine C, plaquettes	Vit K dpte	3-4jours	90	72
Facteur V	Cofacteur Fxa		12-36h	10	330
Facteur VII	Activation FIX, FX	Vit K dpte	4-6h	0,5	50
Facteur VIII	Cofacteur FIXa		10-16h	0,1	330
Facteur IX	Activation FX	Vit K dpte	24h	5	56
Facteur X	Activation FII	Vit K dpte	1-2jours	8	59
Facteur XI	Activation FIX		1-2jours	5	160
Facteur XII	Activation contacte		2-3jours	30	80
Facteur XIII	Fibrinoformation		3-6jours	10	320

**Tableau 8. Synthèse des facteurs de la coagulation et leurs principales caractéristiques**

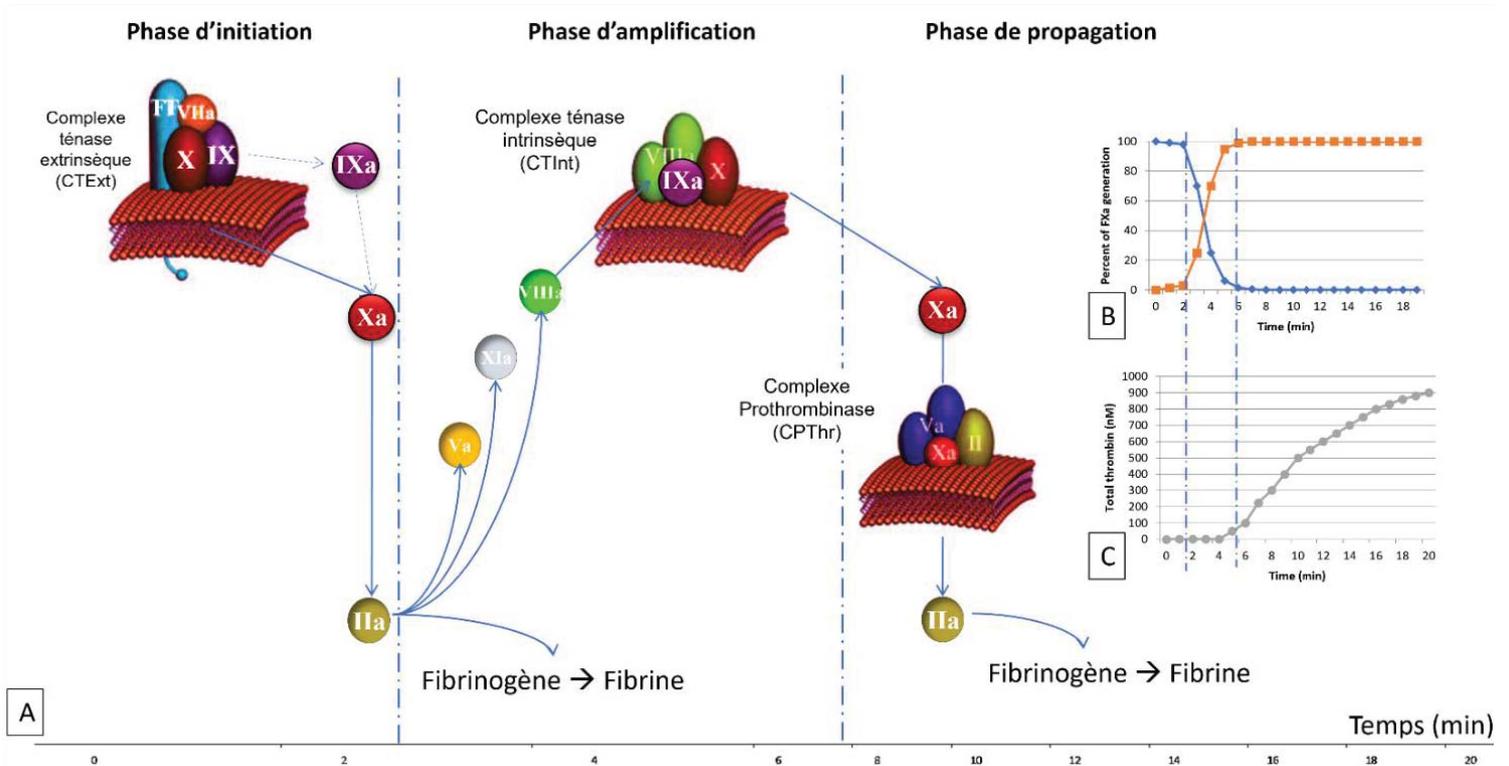
Le poids moléculaire est donné en kilo dalton (kDa).

Abréviations : Vit K, vitamine K ; FV, Facteur V (valable pour les tous les facteurs) ; dpte, dépendante

Source : Encyclopédie médico-chirurgicale – Hémostase : physiologie et principaux tests d'exploration. 2020.

doi : 10.1016/S1634-6939(20)86402-3

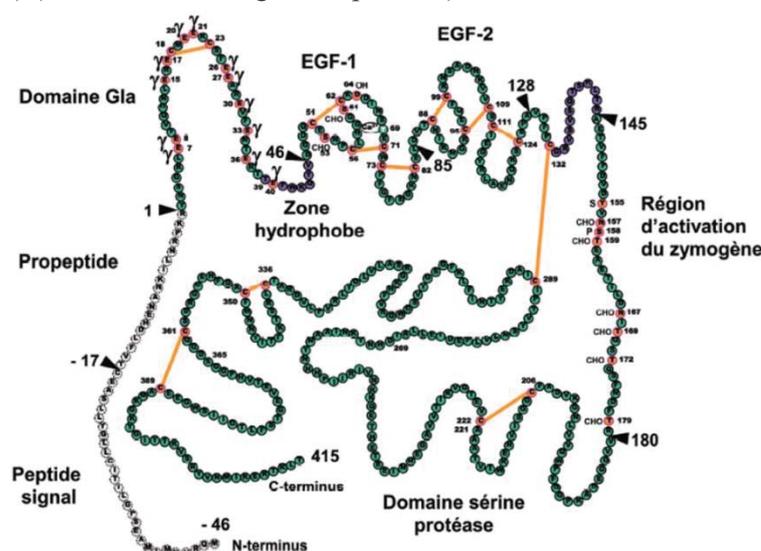
Le processus de coagulation *in vivo* tel qu'il est décrit actuellement peut se décomposer lui-même en 3 phases que sont : la phase d'initiation, la phase d'amplification et la phase de propagation (Figure 53).



### 2.2.3. Physiopathologie de l'hémophilie

Les manifestations hémorragiques de l'hémophilie sont liées à un défaut de la coagulation en raison d'un défaut de génération de thrombine. En l'absence de FVIII ou de FIX, le saignement va persister parce que l'amplification et la génération stable de Fxa sont insuffisantes pour soutenir l'hémostase. Le fonctionnement de la seule voie extrinsèque est insuffisant pour maintenir une hémostase correcte. En effet, chez les sujets sains, c'est la voie intrinsèque qui, générant cinquante fois plus de Fxa, permet la propagation efficace du phénomène de coagulation (Mann, Butenas, et Brummel 2003). L'absence d'un CTInt fonctionnel empêche l'explosion de thrombine nécessaire à la phase de propagation et, indispensable pour stabiliser le caillot de fibrine. L'hémophilie apparaît ainsi comme un défaut de génération de thrombine à la surface des plaquettes, conduisant à la génération plus lente d'un caillot de fibrine de structure altérée. L'HA et l'HB ne peuvent se distinguer cliniquement puisqu'elles sont caractérisées par une symptomatologie hémorragique similaire. La survenue et la répétition des épisodes hémorragiques dépendent de la sévérité du déficit en FVIII ou en FIX (Bolton-Maggs et Pasi 2003).

L'étude qui fait l'objet de ce troisième axe de thèse portant sur l'administration non invasive de FIX recombinant par voie nasale, la suite du manuscrit sera orientée sur le traitement de l'HB et sur le FIX uniquement. L'HB est caractérisée par une déficience en FIX, sans lequel la coagulation est impossible (**Figure 54**) (Mancuso, Mahlangu, et Pipe 2021).

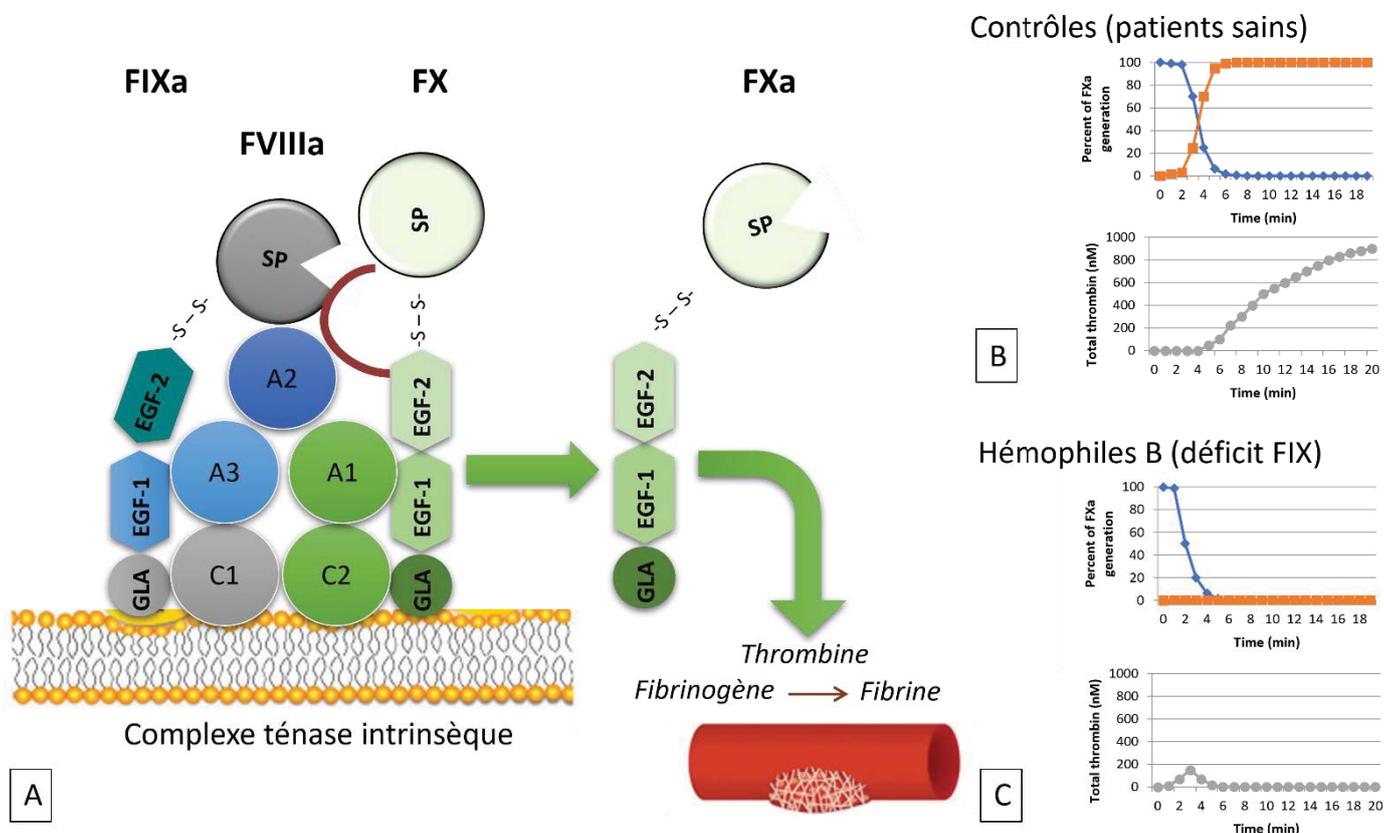


**Figure 54. Structure primaire du Facteur IX (FIX)**

Les lettres représentées sous forme de perles vertes correspondent aux noms des acides aminés appartenant à la protéine circulante de FIX (461 acides aminés). Les régions en majuscule correspondent aux chaînes latérales de la protéine. Certains acides aminés jouant un rôle prépondérant sont identifiés par des flèches noires et leur numéro au sein de la séquence total de 415 acides aminés constituant le FIX circulante. La séquence d'acides aminés ne faisant pas partie de la protéine finale est numérotée négativement. La séquence protéique du précurseur du FIX comprend ainsi : un peptide signal de 28 résidus (position -46 à -17), un propeptide de 18 résidus (-18 à -1) et la séquence correspondant à la protéine circulante (+1 à +415). En orange est précisée la position des 11 ponts disulfures stabilisant le FIX.

Source : (Bond et al. 1998)

Le phénotype hémorragique est globalement corrélé à l'activité coagulante du FIX (FIX :C) dans la circulation sanguine (Bolton-Maggs et Pasi 2003). La structure du CTInt que le FIX forme avec le FVIII et le FX est représentée sur la **Figure 55** avec le détail des taux de thrombine chez un patient sain et chez un patient HB.



**Figure 55. Structure du complexe ténase intrinsèque et évolution du taux de thrombine chez un patient sain et HB**

(A) Le FIX est composé de plusieurs domaines distincts dont les fonctions varient, six domaines principaux ont été identifiés (GLA, la zone hydrophobe, EGF 1, EGF 2, le peptide d'activation et le domaine catalytique). En situation physiologique l'activation du FX en FXa permet la production de thrombine nécessaire à la formation et à la stabilisation du thrombus plaquettaire. (B) Chez un sujet sain, le taux de thrombine (courbe grise) monte dans les premières minutes après activation de l'hémostase dans les suites d'une brèche vasculaire. (C) Chez un patient hémophile B, l'absence de complexe ténase intrinsèque (courbe orange), ne permet pas l'activation franche du FX en FXa et la genèse de thrombine est insuffisante (courbe grise). Abréviations : GLA, Domaine composé de 39 résidus issus de la traduction des exons 2 et 3 et caractérisé par la présence de 12 acides  $\gamma$  carboxyglutamiques qui interagissent avec les plaquettes, le FVIIIa et le FVIIa-FT ; EGF 1&2, 2 domaines en tandem homologue à la structure du facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor) ; A & C, domaine de la chaîne légère et lourde du FVIII ; SP, domaine de la chaîne lourde du FIX Source : archives du Dr. Sandra Le Quellec, MCU-PH, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL

## 2.2.4. Symptomatologie de l'hémophilie

En fonction du niveau de ce déficit, on peut distinguer 3 formes d'hémophilie, mineure, modérée ou sévère. Cette classification permet de déterminer le risque hémorragique, de guider la stratégie thérapeutique, de prédire les événements et de prévenir les complications. Il est à noter que dans la majorité des cas, la sévérité biologique voire clinique est la même chez tous les membres d'une même famille et reste stable au cours du temps. Il peut cependant exister un profil clinico-biologique discordant entre les niveaux biologiques et la sévérité de la symptomatologie. Les hémorragies de l'hémophilie sévère présentent des caractéristiques particulières. Ainsi les hémorragies extériorisées sont rares, il s'agit essentiellement d'hémorragies internes : 70-90% des saignements spontanés chez l'hémophile sévère sont de localisation intra-articulaires (hémarthroses), 10-20% d'origine musculaire (hématomes) ; 5-10% intra cavitaires : hématuries, hémorragies digestives, hémorragies intracérébrales (Simpson et Valentino 2012). Le signe pathognomonique de l'hémophilie sévère demeure la survenue d'hémarthroses, douloureuses et destructrices si insuffisamment traitées, c'est l'arthropathie hémophilique (Simpson et Valentino 2012). Les saignements musculaires peuvent engager le pronostic fonctionnel ou vital. C'est la raison pour laquelle les IM sont interdites (DiMichele *et al.* 2007).

## 2.3. Prise en charge de l'hémophilie

### 2.3.1. Principes de prise en charge

#### a. Traitements

Le traitement de l'HB a longtemps consisté à remplacer le facteur manquant par l'apport de FIX exogène (Aledort 2001). Ces FAH peuvent être d'origine plasmatique, obtenus à partir de donneurs, ou d'origine recombinante, c'est-à-dire produits par les biotechnologies. Ils sont administrés par voie IV à la demande ou en prophylaxie et peuvent dans certains cas entraîner l'apparition d'Ac anti-FIX, appelés inhibiteurs (Boekhorst *et al.* 2008; Schwaab *et al.* 1995). Pour simplifier la prise en charge, seules les modalités de traitement des malades atteints d'HB sans inhibiteur seront décrits. En effet, l'étude preuve de concept qui fait l'objet de ce manuscrit concerne l'HB sans inhibiteur car ils sont rares.

Le traitement à la demande consiste à injecter du FIX quand les saignements apparaissent. Le but est d'arrêter rapidement le saignement pour limiter son extension et ses complications à court et long termes. Plusieurs injections peuvent être nécessaires pour traiter un épisode hémorragique. La dose et la fréquence des injections dépendent de l'intensité du saignement, de sa localisation et du risque fonctionnel et/ou vital associé. Les taux de facteurs à atteindre selon le niveau du risque hémorragique sont décrits dans le **tableau 9** (Hanley *et al.* 2017).

Taux de FIX :C	Classification	Symptomatologie clinique en l'absence de traitement
>5-40 UI/dL (>5%-40% de la normale)	Mineure	Absence de saignement spontané ; saignement après chirurgie, extraction dentaire et accidents
>1-5 UI/dL (>1%-5% de la normale)	Modérée	Hémarthroses et hématomes musculaires après traumatismes légers ; saignements excessifs après chirurgie et extraction dentaire
<1 UI/dL (>1% de la normale)	Sévère	Hémarthroses et hématomes musculaires spontanés, saignements post-traumatiques (accidents, chirurgie)

**Tableau 9. Taux de FIX :C selon la sévérité de l'hémophilie et conséquences cliniques**

*Synthèse de la classification de la sévérité de l'hémophilie en fonction de l'activité résiduelle du FIX exprimée en UI/dL ou en % de la normale. L'objectif est de maintenir les patients à un taux >1% lorsqu'ils présentent une hémophilie sévère pour éviter les saignements spontanés et l'arthropathie hémophilique.*

*Abréviations : FIX, Facteur IX ; FIX :C, activité du FIX en % ou en UI/dL.*

*Source : (Haute Autorité de Santé 2019)*

Dans l'HB sévère, le traitement de substitution est très efficace mais est limité par la fréquence des injections de concentrés de FIX et les problèmes de coût (Enjolras *et al.* 2015). En effet, le traitement actuel de cette maladie consiste en l'administration IV régulière et à long terme de FIX non modifié (rFIX) ou de FIX modifié comme décrit précédemment. Les FIX modifiés sont synthétisés pour améliorer leur demi-vie et leur liaison au FcRN, (rFIX-Fc). Ces FAH sont administrés lorsque les saignements se produisent (traitement à la demande) comme décrit ci-dessus ou avant qu'ils ne se produisent (traitement prophylactique), comme détaillé juste après.

### b. Prophylaxie

La prophylaxie est un traitement qui comporte des injections IV de FIX, répétées à intervalles réguliers, visant à prévenir l'apparition d'un saignement, et à réduire leur fréquence. Elle est recommandée précocement chez tous les malades atteints d'HB sévère et vise la prévention des hémarthroses spontanées, de l'arthropathie hémophilique et des saignements graves (D. Noone *et al.* 2013; Ljung 2009). La prophylaxie est dite primaire (début avant l'âge de 3 ans et avant la 2<sup>ème</sup> hémarthrose) ou secondaire (toutes les autres situations) et elle doit être mise en place dans un objectif de longue durée. En France depuis les recommandations de la coordination médicale pour l'étude et le traitement des maladies hémorragiques constitutionnelles (CoMETH) (Sandrine Meunier *et al.* 2013), une prophylaxie progressivement intensifiée selon le modèle canadien est privilégiée (B. M. Feldman *et al.* 2006). Les 3 paliers de traitements de l'HB sont détaillés dans le **tableau 10**.

Palier de prophylaxie	Dose/Schéma pour le FIX
1 <sup>er</sup> palier	70 UI/kg, 1 fois/S
2 <sup>ème</sup> palier	50 UI/kg, 2 fois/S ou /96h
3 <sup>ème</sup> palier	50 UI/kg /72h

**Tableau 10. Posologie et fréquence des administrations par palier**

Source (Sandrine Meunier *et al.* 2013; S. Meunier *et al.* 2009)

Ce schéma progressif a un triple objectif : i) une meilleure acceptabilité initiale pour l'enfant et sa famille ; ii) une meilleure observance sur le long terme ; et iii) une diminution des problématiques d'accès veineux. Les objectifs cibles exprimés en termes d'activité du FIX sont détaillés dans le **tableau 11**.

Niveau de risque hémorragique/ Type de chirurgie	Objectif cible de FIX :C
Risque mineur : hémarthrose, saignement musculaire ou buccal	30-50 UI/dL
Risque modéré : hématome	50-80 UI/dL
Risque majeur : hémorragie mettant en jeu le pronostic vital	80-110 UI/dL
Chirurgie à risque mineur dont extraction dentaire	50-80 UI/dL
Chirurgie à risque hémorragique majeur	80-100 UI/dL

**Tableau 11. Objectifs cibles en FIX :C en fonction du niveau de risque hémorragique**

Abréviations : FIX :C, activité du Facteur IX dans le plasma

Source (Hanley *et al.* 2017)

Au total, les traitements à la demande et prophylactiques peuvent être administrés jusqu'à trois fois par semaine (Le Quellec *et al.* 2018; Nederlof *et al.* 2020), ce qui impacte considérablement la qualité de vie des patients (Arya *et al.* 2022; Perot *et al.* 2015). Il est donc important de développer des alternatives à la voie d'administration IV pour le traitement de l'hémophilie. Les schémas posologiques pour les FIX recombinants à demi-vie standard (SHL-rFIX) ne seront pas détaillés car cela dépasse les objectifs de l'étude qui fait l'objet de cette thèse. En revanche, les FIX recombinants à demi-vie allongée (EHL-rFX) seront détaillés au sein d'un chapitre dédié (chapitre 2.3.2.), car l'Eftrenonacog alfa a été choisi comme molécule thérapeutique pour ce travail.

### c. Complications

#### **Risques Infectieux**

Dès la fin des années 1980, les FAH d'origine plasmatique obtenus à partir de larges pools de plasmas (>20 000 donneurs) avaient été reconnus responsables de la transmission du VIH, du VHB, et du VHC (Craske, Dilling, et Stern 1975; Bolton-Maggs et Pasi 2003). Cependant depuis 1987, grâce aux différents procédés de sécurisation des produits sanguins labiles et des médicaments dérivés du sang (chauffage, pasteurisation, nanofiltration et utilisation de solvant/détergent), aucun cas de contamination par l'un des trois virus n'a été reporté en France (Burnouf et Radosevich 2003). En revanche des questions demeurent quant à la transmission du variant de Creutzfeldt-Jakob (Zaman *et al.* 2011) même si la transmission n'a jamais été mise en évidence (Evatt *et al.* 2002).

#### **Développements d'inhibiteurs**

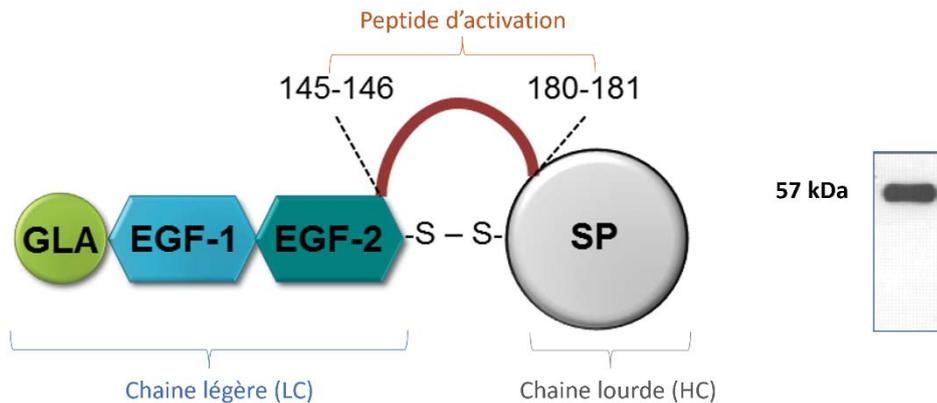
Les inhibiteurs sont des Ac pathologiques circulants dirigés contre le facteur déficitaire reconnu comme Ag et capables d'inactiver ses fonctions. L'apparition d'inhibiteurs anti-FIX (estimé entre 1,5 et 3% chez les patients HB) complique la prise en charge puisque les FIX habituellement administrés ne sont plus efficaces. Le pronostic fonctionnel est compromis et l'espérance de vie réduite (Boekhorst *et al.* 2008; Lloyd Jones *et al.* 2003). Les raisons de leur développement ne sont pas clairement connues mais un certain nombre de facteurs de risque ont été identifiés. Parmi ceux-ci, on distingue les facteurs de risque génétiques tels que : les antécédents familiaux (Gill 1999) ; l'ethnie (incidence plus élevée chez les patients d'origine afro-américaine et hispanique *vs.* les patients d'origine caucasienne) (Aledort et Dimichele 1998) ; le type de mutation (S. C. Gouw *et al.* 2007) ; et, certains polymorphismes dans les gènes associés aux fonctions immunitaires. Ensuite, il existe des facteurs de risque non génétiques tels que : i/ les modalités du traitement substitutif, en effet, la prophylaxie serait protectrice par rapport au traitement à la demande (Samantha C. Gouw *et al.* 2013) ; ii/ l'origine du FAH, surrisque des FVIII recombinant *vs.* FVIII plasmatiques dans un ECR international réalisé chez des patients naïfs de tout traitement (44,5% d'inhibiteurs *vs.* 26,8% dans le groupe FVIII plasmatique) (étude SIPPET) (Peyvandi *et al.* 2016) ; et iii/ l'état du système immunitaire du malade au moment des premières injections.

Les infections, les actes chirurgicaux ou les vaccinations qui peuvent être concomitants à l'administration de FAH chez les patients, ont souvent été évoqués comme des événements susceptibles de générer des signaux de danger capables d'activer la réponse immunitaire contre les FAH thérapeutiques. Cependant, des expériences récentes sur modèles murins et humains ont invalidé cette hypothèse (Lai *et al.* 2016; Platokouki *et al.* 2018). A ce jour, aucune étude n'a permis d'identifier d'événements particuliers, source de l'induction de signaux de danger, dont le contrôle préviendrait ou réduirait l'intensité de la réponse immunitaire contre les FAH thérapeutiques. Il est donc possible que le niveau d'activation basal du système immunitaire soit suffisant pour permettre la stimulation de LT naïfs spécifiques du FIX, si une quantité suffisante de FAH est présentée aux LT.

## 2.3.2. Facteurs anti-hémophiliques

### a. Facteurs IX commercialisés

Le nonacog alfa (Benefix®), FIX recombinant thérapeutique (rFIX) est formé d'une simple chaîne glycoprotéique dont le poids moléculaire est d'environ 55kDa. Il appartient à la famille des sérine-protéases et des facteurs de coagulation vitamine K dépendants. C'est une protéine obtenue à partir d'un ADN recombinant, ayant des caractéristiques structurales et fonctionnelles comparables à celles du FIX endogène (**Figure 56**).



**Figure 56. Représentation schématique du nonacog alfa (rFIX)**

*Abréviations : GLA, domaine composé de 39 acides aminés issus de la traduction des exons 2 et 3 et caractérisé par la présence de 12 acides  $\gamma$  carboxyglutamiques qui interagissent avec les plaquettes, le FVIIIa et le FVIIa-FT ; EGF 1&2, 2 domaines en tandem homologues à la structure du facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor) ; SP, domaine de la chaîne lourde du FIX*

*Source : archives du Dr. Sandra Le Quellec, MCU-PH, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL*

Lorsque le processus de coagulation se met en place, les premiers partenaires du FIX circulant sont ses activateurs : le complexe FVIIa-FT et le FXIa. Quelle que soit l'enzyme impliquée, l'activation du FIX se déroule en deux temps. Le clivage entre les résidus d'a.a. 145 et 146 génère le FIX $\alpha$ , intermédiaire constitué de 2 chaînes : une chaîne légère de 18kDa qui correspond à celle du FIX $\alpha$  et une chaîne lourde de 46kDa qui comprend le domaine catalytique ainsi que le peptide d'activation. Le second clivage entre les résidus d'a.a. 180 et 181 permet la libération du peptide d'activation de 11kDa et ainsi la formation du FIX $\alpha\beta$  composé d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde, respectivement de 18kDa et de 28kDa, reliées entre elles par un pont disulfure (Di Scipio, Kurachi, et Davie 1978). Le FIX $\alpha$  n'est pas actif et doit obligatoirement être clivé pour devenir le FIX $\alpha\beta$  fonctionnel. Une mutation au niveau des résidus 145 ou 180 provoque l'HB.

## b. Facteurs recombinants à demi-vie allongée

### Concept d'allongement de la demi-vie

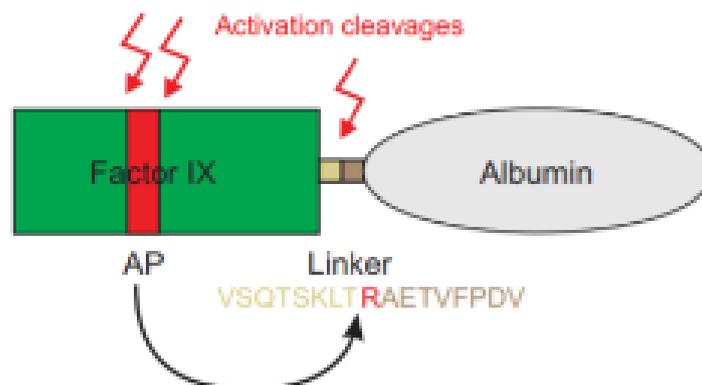
Le développement de FAH à demi-vie allongée vise à alléger les contraintes d'administration dans le cadre de la prophylaxie, notamment chez le jeune enfant, en diminuant le nombre d'injections IV hebdomadaires ou le recours potentiel à un dispositif d'accès veineux central tel qu'une chambre implantable. Deux techniques sont actuellement utilisées pour prolonger la demi-vie des FAH : i/ l'ajout de modifications biochimiques sur les protéines de rFIX recombinantes, telles que la glycoPEGylation ; et, ii/ la fusion génétique des protéines de rFIX à d'autres protéines ayant une demi-vie plus longue telles que l'albumine (Alb) et les fragments Fc des IgG (Fc).

### La glycoPEGylation

La PEGylation consiste à lier de façon covalente une molécule de polyéthylène glycol (PEG) à une autre protéine. Les molécules de PEG sont des polyéthers solubles dans l'eau. Elles augmentent considérablement la taille de la protéine à laquelle elles sont liées, ce qui a pour conséquence : i/ la réduction de la clairance totale de la protéine PEGylée par diminution de la diffusion transmembranaire ; ii/ la protection de la protéine PEGylée contre la dégradation protéolytique par encombrement stérique ; et iii/ la réduction de l'immunogénicité globale de la protéine PEGylée en masquant certains épitopes immunogènes (la molécule de PEG étant considérée comme non immunogène). Un seul rFIX glycoPEGylé a été développé, il s'agit du nonacog beta pegol (rFIX-GP) (Negrier *et al.* 2011).

### Protéines de fusion

Bien que les deux protéines fusionnées (Alb et Fc) soient différentes, le mécanisme responsable de l'allongement de la demi-vie est similaire grâce à un processus de recyclage cellulaire dépendant du FcRn. La fusion génétique à l'albumine n'a été appliquée qu'au rFIX, il s'agit de l'Albutrepanonacog alfa (Idelvion®). Entre les molécules d'albumine et de rFIX a été insérée une séquence protéique appelée *linker*, dérivée du peptide d'activation du FIX. Cette séquence linker est donc clivable par le FXIa ou par le complexe FVIIa-FT, permettant ainsi l'élimination du fragment albumine lors de l'activation du rFIX (**Figure 57**).



**Figure 57. Représentation schématique de l'Albutrepanonacog alfa (rFIX-Alb)**

Source (Schulte 2009)

La fusion covalente du fragment Fc humain d'une IgG1 à l'extrémité C terminale du FIX sauvage a donné naissance à l'Eftrenonacog alfa (Aprolix®) (Fischer *et al.* 2017; Shapiro *et al.* 2012; R. T. Peters *et al.* 2010) dont les caractéristiques vont être détaillées ci-dessous car il s'agit du traitement qui fait l'objet de l'étude sur l'administration nasale de FIX qui appartient à ce manuscrit.

**rFIX à demi-vie allongée (EHL-rFIX)**

En France, deux EHL-rFIX ont l'AMM, l'Eftrenonacog alfa (Alprolix®, SOBI, Stockholm, Suède) et l'Albutrepenonacog alfa (Idelvion®, Melbourne, Australie) avec un service médical rendu (SMR) jugé important et une amélioration du service médical rendu (AMSR) de niveau IV selon l'avis de la commission de transparence de la HAS du 05/10/2016 ([https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2671437/fr/commission-de-la-transparence-reunion-du-5-octobre-2016](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2671437/fr/commission-de-la-transparence-reunion-du-5-octobre-2016)). Le nonacog beta pré-gol (Refixia®) a obtenu un SMR jugé insuffisant et un avis défavorable dans cette indication et aux posologies de l'AMM (avis de la commission de transparence du 31 janvier 2018).

Les données PKs ont été évaluées au cours d'ECR pour chaque spécialité pharmaceutique. La mesure demi-vie est influencée par le type de méthode de dosage de l'activité du FIX (FIX :C). La méthode la plus répandue pour le suivi des patients HB est la méthode chronométrique (Kitchen, Gray, et Mertens 2014). Les résultats des dosages par méthode chromogénique sont comparables à ceux obtenus par méthode chronométrique chez des patients substitués (Bowyer *et al.* 2016; H. V. Wilmot, Hogwood, et Gray 2014). La méthode chromogénique qui fait référence pour la pharmacopée européenne a donc été utilisée dans la suite du travail (voir chapitre 4.5.5.). Les résultats des demi-vies des différents EHL-rFIX, tels que décrits dans la littérature, ont été présentés dans le **Tableau 12**.

DCI	Nonacog alfa	Nonacog gamma	Eftrenonacog alfa	Nonacog beta pegol	Albutrepenonacog alfa
Nom déposé	Benefix®	Rixubis®	Alprolix®	Refixia®	Idelvion®
Industriel	Pfizer	Shire	SOBI	Novo Nordisk	CSL Behring
Origine/ Lignée cellulaire	Recombinant/ Cellule CHO	Recombinant/ Cellule CHO	Recombinant/ Cellule HEK	Recombinant/ Cellule CHO	Recombinant/ Cellule CHO
Structure	rFIX	rFIX $\gamma$	rFIX-Fc	rFIX-GP	rFIX-Alb
Poids moléculaire	55kDa	68kDa	68kda	40kDa	125kDa
Demi-vie	34h	27h	82h	96h	92h
Date de l'AMM	30/07/2007	19/12/2014	12/05/2016	06/06/2017	11/05/2016

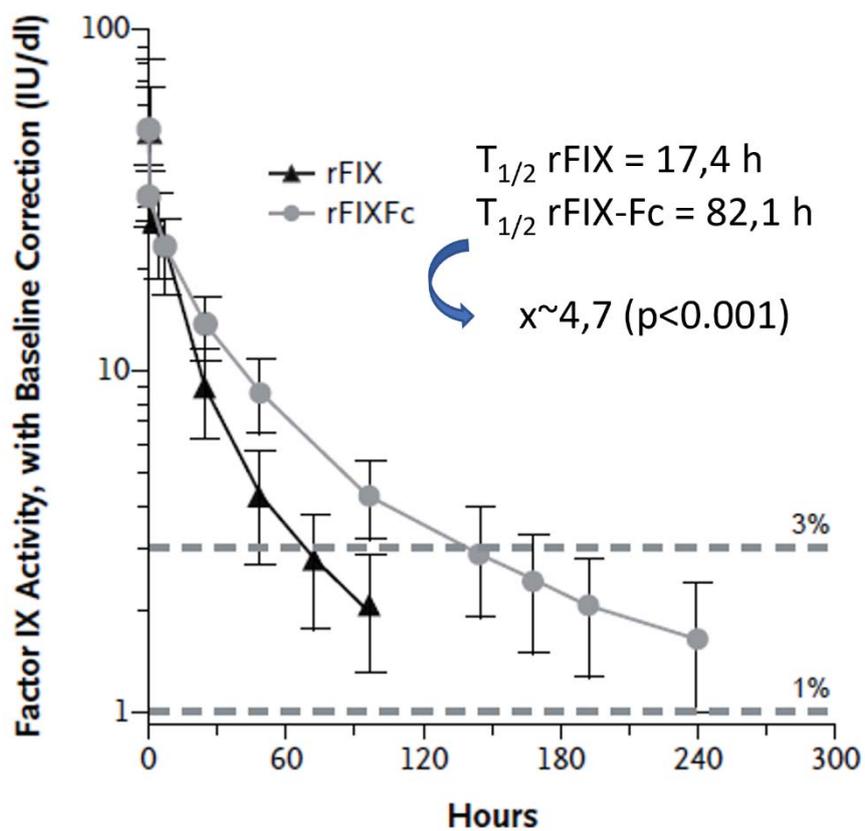
**Tableau 12. Caractéristiques structurales et AMM des molécules thérapeutiques de FIX**

*Les demi-vies correspondent aux valeurs mesurées à l'aide de la méthode chronométrique chez des patients de plus de 12ans.*

*Abréviations : CHO, lignée cellulaire issue d'ovaire de Hamster de Chine ; HEK, lignée cellulaire issue de rein embryonnaire humain ; SMR, Service Médical Rendu ;*

*Source : Avis des commissions de transparence pour chacune des molécules, accessible en ligne sur le site de la HAS (<https://www.has-sante.fr/>) et monographies produits accessible sur le Vidal.*

Seules les données concernant le rFIX-Fc qui a été utilisé dans l'étude, seront détaillées. Avec une demi-vie de 82h, le rFIX-Fc a une demi-vie 2,4 fois supérieure à celle du rFIX (**Figure 58**). Dans un ECR incluant 50 centres, 17 pays et 123 patients HB, l'efficacité et la sécurité du rFIX-Fc dans le traitement et la prévention des épisodes hémorragiques, y compris lors de chirurgies majeures chez des adolescents et des adultes HB, ont été démontrées avec un espacement des administrations toutes les 1 à 2 semaines (Powell *et al.* 2013). Les mêmes résultats ont été observés dans une population pédiatrique (n=27) (Fischer *et al.* 2017). Ainsi, le profil PK des rFIX est bien amélioré par les techniques d'allongement de la demi-vie. Cependant, les études de qualité de vie doivent être menées en parallèle afin de mesurer si cette dernière a évolué par rapport à l'utilisation du FIX standard. Il est licite de s'interroger sur l'espacement des administrations IV, comme seul élément permettant d'améliorer la qualité de vie des patients ; le développement de voies d'administrations non invasives semble plus prometteur.



**Figure 58. Evolution de l'activité du rFIX et du rFIX-Fc au cours du temps**

En ordonnée l'activité du FIX exprimée en UI/dL et normalisée par rapport à la valeur à T0, en abscisse le temps en heures.

Source : (Powell et al. 2013)

### 3. Problématique

Notre équipe a précédemment démontré l'intérêt du FcRn pour le passage à travers l'épithélium nasal d'une biothérapie, l'infliximab (Bequignon *et al.* 2019), ouvrant la réflexion sur le potentiel d'administration par voie nasale de biothérapies utilisables dans la PNS mais également d'autres biothérapies utilisables pour le traitement d'autres pathologies. De nombreuses questions étaient soulevées :

- Est-ce que les biothérapies ayant l'AMM en France dans la PNS (dupilumab et mépolizumab) peuvent traverser la barrière épithéliale *in vitro* ?
- Est-ce que ces biothérapies pourraient être plus efficaces après administration par voie nasale via un effet direct ou seraient-elles d'abord transcytosées pour avoir ensuite un effet systémique sur l'inflammation T2 ?
- Quelles sont les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des biothérapies si on suppose qu'un passage transépithélial est possible ?
- Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le passage transépithélial de biothérapies au niveau nasal ?
- Quelle est la place du FcRn dans le transport transmuqueux de biothérapies ?

En revanche, comme nous l'avons expliqué au début de ce manuscrit, la transcytose des biothérapies n'a pu être étudiée, mais le développement de la voie nasale n'a pas été abandonné. Pour permettre de poursuivre ces travaux et de développer mon activité de recherche à Lyon, en collaboration avec le LBTI, un protocole d'expérimentation animale sur modèle murin pour étudier l'administration nasale de FAH appliqué à l'HB a été déposé. Les questions en suspens étaient :

- Est-ce que les biothérapies ayant l'AMM en France pour l'HB (rFIX, rFIX-Fc, rFIX-Alb) peuvent traverser la barrière épithéliale *in vitro* ? *in vivo* ?
- Est-ce que les biothérapies conservent leur propriétés structurales et leurs potentiels anticoagulants après administration nasale ?
- Est-ce que le mécanisme de la transcytose des FAH est FcRn-dépendant ?

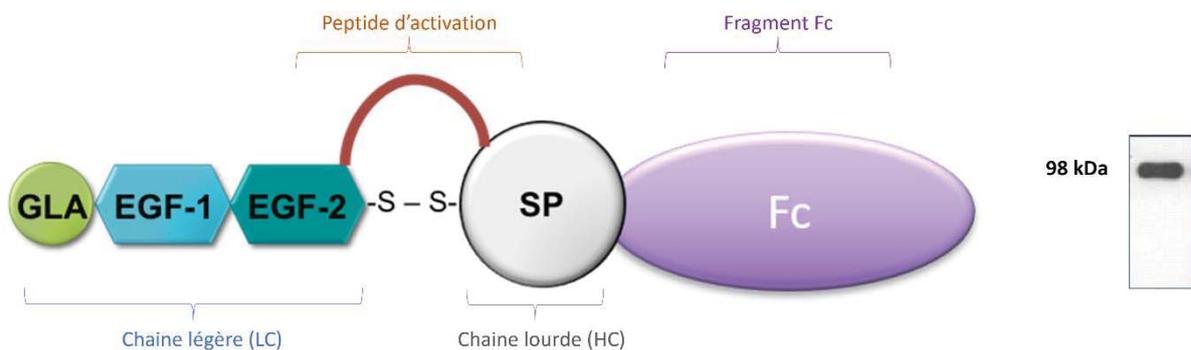
Nous avons réalisé une revue systématique de la littérature sur le FcRn et son intérêt potentiel dans la voie d'administration nasale, qui a été publiée dans l'*IJMS* (IF = 6, rang B) en 2021 (*FcRn as a Transporter for Nasal Delivery of Biologics : A Systematic Review. Int J Mol Sci.*), et qui est présentée dans le chapitre 6. Puis nous avons étudié l'administration nasale du rFIX-Fc *in vivo* sur modèles murins. Ce deuxième travail a été soumis sous la forme d'un *brief report* au *JTH*, pour lequel les révisions sont en attente (*In vivo intranasal delivery of coagulation factor IX : a proof-of-concept study*).

## 4. Méthodes pour l'administration nasale de Facteur IX

### 4.1 Introduction

Le nez apparaît comme l'organe idéal pour la diffusion non invasive de biothérapies en alternative aux voies IV ou SC utilisées dans le traitement de nombreuses pathologies. L'évaluation du rôle du FcRn dans l'administration IN de biothérapies comme celles utilisées dans le traitement de la PNS ou de l'hémophilie n'a jamais été réalisée, ni sur cultures primaires de CENH *in vitro*, ni chez l'animal *in vivo*. La structure et les fonctions du FcRn ont été rappelées dans le chapitre 2.1.

L'étude preuve de concept qui fait l'objet de ce manuscrit concerne l'administration de rFIX de demi-vie allongée (EHL-rFIX) grâce à une fusion au fragment Fc d'une IgG, l'Eftrenonacog alfa (rFIX-Fc, Alprolix®), **Figure 59**.



**Figure 59. Représentation schématique de l'Eftrenonacog alfa (rFIX-Fc)**

*Abréviations : GLA, domaine composé de 39 acides aminés issus de la traduction des exons 2 et 3 et caractérisé par la présence de 12 acides  $\gamma$  carboxyglutamiques qui interagissent avec les plaquettes, le FVIIIa et le FVIIa-FT ; EGF 1&2, 2 domaines en tandem homologue à la structure du facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor) ; SP, domaine de la chaîne lourde du FIX ; Fc, Fragment cristallisable du FcRn.*

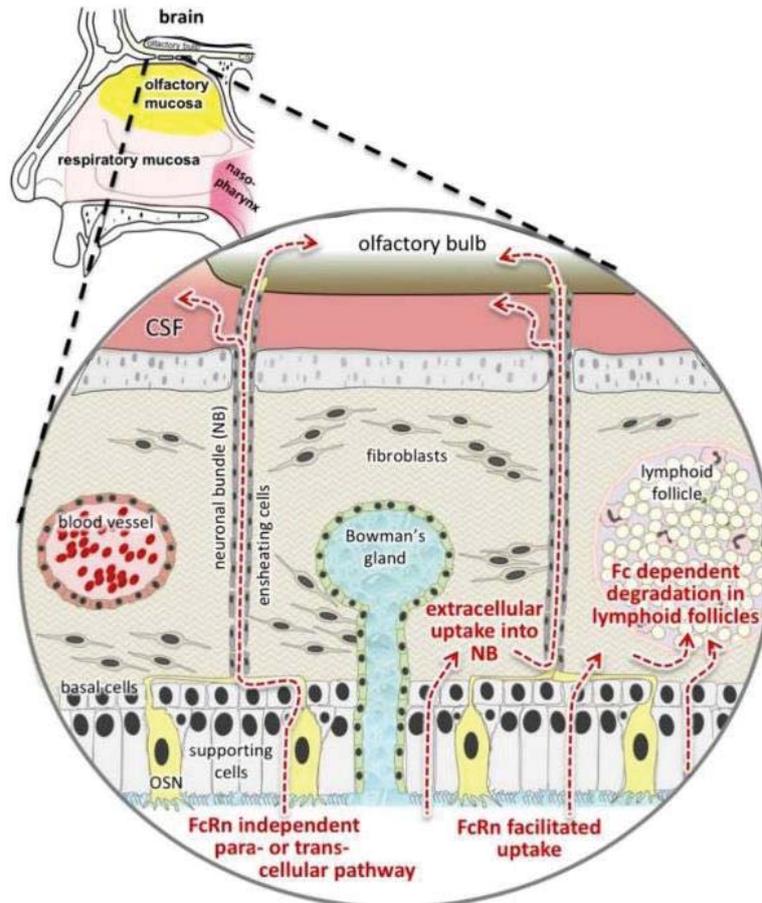
*Source : archives du Dr. Sandra Le Quellec, MCU-PH, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL*

L'ensemble des méthodes nécessaires à la réalisation de ce travail est détaillé ci-dessous. Le choix du modèle murin, les méthodes d'administration nasale et enfin, les différents moyens de mesure du FIX dans le plasma permettant d'évaluer l'efficacité de son passage transmuqueux seront décrits dans le chapitre 4.5. Les résultats de ce projet ont fait l'objet d'un article soumis pour publication dont les résultats sont présentés dans le chapitre 7. L'ensemble des animaux étaient hébergés au sein du PBES (Lyon, France) affilié à l'École Normale Supérieure et situé à proximité des locaux du LBTI où travaille l'équipe dirigée par M. Bernard Verrier et Mme Claire Monge, co-responsables de ce projet multidisciplinaire translationnel construit par le Dr. Sandra Le Quellec, MCU-PH en hémostase aux Hospices Civils de Lyon.

Les bénéfices attendus du développement de voies d'administration non invasives pour les FAH pour le traitement de l'HB sont multiples : améliorer l'adhésion au traitement, l'observance, la qualité de vie en réduisant les contraintes liées aux injections répétées et aussi éviter des réactions de défense de l'organisme en évitant le tube digestif (comprimé) et la circulation sanguine (administration par voie intraveineuse). Un rappel des voies de passage nasal est présenté dans la **Figure 60**.

## 4.2. Voies de passages nasales de molécules thérapeutiques

La muqueuse nasale est constituée d'un épithélium respiratoire à 97% et d'un épithélium olfactif. Il s'agit d'épithéliums polarisés avec un pôle apical et un pôle basolatéral séparé par des JS assurant la fonction de barrière précédemment décrite et s'opposant à la diffusion des molécules (Axe 2) (Stevenson *et al.* 1986). Deux voies de passage au travers de l'épithélium ont été décrites, une transcellulaire (ou transcytose) et une paracellulaire passive (**Figure 60**) (Sonaje *et al.* 2012; Ugwoke *et al.* 2005).



**Figure 60. Schéma de l'épithélium nasal et voies de passages des molécules thérapeutiques**

Source : (Ladel *et al.* 2018)

La transcytose est un mécanisme actif qui implique que la biothérapie traverse la membrane cellulaire mais les mécanismes précis sont mal connus (Keller, Merkel, et Popp 2022). Le rôle du FcRn dans la transcytose de biothérapies a été bien décrit (chapitre 2.1 et 6). En revanche, il existe très probablement des mécanismes de transcytose FcRn indépendants. Le passage paracellulaire passif implique le passage des biothérapies à travers les JS. Ce passage est facilité en cas d'augmentation de la perméabilité épithéliale, ce qui est le cas en situation inflammatoire ou alors grâce à l'utilisation d'additif comme le chitosan qui ouvre les JS (Spindler *et al.* 2021).

Pour diffuser dans le sang après administration IN, une molécule thérapeutique doit être administrée sous forme de petites gouttes pulvérisées dans l'air. Une fois absorbé, le médicament pénétrera dans la circulation sanguine ce qui permettra une action rapide (Benedict *et al.* 2011; Winner *et al.* 2000; Brambilla *et al.* 2016). L'intérêt d'une administration nasale est d'éviter la diffusion dans tout l'organisme du principe actif diluant l'effet sur les tissus cibles et augmentant le risque d'EI.

## 4.3. Modèles murins

### 4.3.1. Introduction

Le modèle murin est adapté pour des études précliniques en raison à la fois de sa taille, de sa maniabilité et des possibilités de modifications génétiques. Des souches de souris humanisées pour le FcRn (hFcRn) existent et elles sont considérées aujourd'hui comme le modèle de référence pour l'évaluation des thérapeutiques ciblant le FcRn (Guillon *et al.* 2019). De la même façon, des souches murines déficientes pour le FcRn (FcRn KO) existent permettant une approche mécanistique du transport transmuqueux (Azevedo *et al.* 2021). Enfin des souches de souris déficientes pour le FIX (FIX KO) existent permettant de tester l'efficacité du rFIX délivré chez des souris HB. Les règles de remplacement, de réduction et de raffinement obligatoires pour tout protocole d'expérimentation animale ont été respectées et détaillées.

### 4.3.2. Les espèces animales utilisées

#### a. Souches

Des analyses préliminaires sur modèle murin (souris *mus musculus*) étaient nécessaires avant tout transfert de résultats chez l'Homme. En effet, la toxicité des FAH sur les muqueuses n'a pas été étudiée *in vivo* et donc le recours à l'Homme n'était pas possible. Ensuite, l'étude de la coagulation nécessite un modèle vivant, dynamique, doté d'un système vasculaire. Le recours à l'animal vivant était donc justifié pour l'analyse des effets doses et effets temps après administration des médicaments, et les analyses PK et PD étaient le cœur de ce projet innovant. De la même façon, seul un modèle vivant peut être utilisé pour évaluer l'efficacité d'une nouvelle voie d'administration, car des tests de saignement sont prévus par la suite. Cette étude ne pouvait donc pas encore être réalisée chez l'Homme car cela mettrait en jeu le pronostic fonctionnel ou vital de patients hémophiles et le volume sanguin requis pour l'ensemble des analyses nécessaires à ce travail était trop important dans un délai trop court.

Parmi les modèles animaux utilisés à des fins de recherche scientifique, le choix d'un modèle murin a été fait car il s'agit de la seule espèce animale, après le chien hémophile, à permettre le dosage d'activité des FAH. En effet, leur dosage ne peut être effectué qu'en l'absence des protéines analogues du modèle. Le statut hémophile (FIX KO) est donc indispensable. Enfin, les deux modèles murins hémophiles sont très bien caractérisés génétiquement, c'est pourquoi l'utilisation d'animaux vivants pour cette étude se justifiait à tous les niveaux.

Plusieurs lignées génétiquement modifiées ont été utilisées pour ce travail, mais un seul phénotype était considéré comme dommageable, ce sont les souris FIX KO (numéro d'agrément, 1486). L'ensemble des animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales de ce travail était élevé à cette fin et provenait de fournisseurs agréés (Charles Rivers Laboratory, Les Oncins, Saint Germain Nuelles, France).

#### b. Caractéristiques des modèles murins

Les expériences ont été effectuées sur des souris sevrées depuis 3-4 semaines (le sevrage se fait entre 3 et 4 semaines de vie selon la taille des souriceaux). Ces souris (entre 6 et 12 semaines) étaient pesées quotidiennement à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine de sevrage pour vérifier qu'elles avaient le poids idéal (soit au moins 20-25g), permettant l'administration d'un maximum de 10µl par narine. En effet, les souris jeunes présentent des parois vasculaires plus propices à une bonne efficacité des molécules à tester, ce qui nous permettait de nous rapprocher des conditions chez l'Homme. En revanche pour conserver une excellente extrapolabilité des résultats, une large gamme d'âge avait été sélectionnée, seul le poids trop faible était limitant (poids < 20g). Au total, les modèles murins sélectionnés étaient bien représentatifs du profil hémorragique observé dans l'hémophilie. Des individus plus âgés ont un profil hémostatique atténué causé par une augmentation de l'expression du facteur de Von Willebrand. Ce

dernier favorise la coagulation, ce pourquoi il n'était pas prévu d'utiliser initialement de souris plus âgées. En raison de problème de transfert d'animaux, certains tests ont été réalisés chez des souris âgées (70 semaines), et de façon surprenante les résultats étaient similaires (voir chapitre 7).

Des souris mâles et femelles ont été utilisées car aucune différence d'effet n'était attendue pour les paramètres étudiés. En utilisant l'ensemble des souris issues de l'élevage sans tenir en compte de leur sexe, cela facilitait le respect du principe de réduction.

#### 4.3.3. Points limites

Les souris étaient observées de façon régulière par un examinateur formé tout au long des expérimentations afin de surveiller l'apparition de points limites : altération du pelage (poils sales, rugueux), dyspnée persistante, prostration, une blessure, un saignement dont l'hémostase spontanée n'était pas achevée dans les 5 minutes suivant sa constatation, et ce malgré une compression directe.

#### 4.3.4. Méthodes pour assurer le bien-être animal

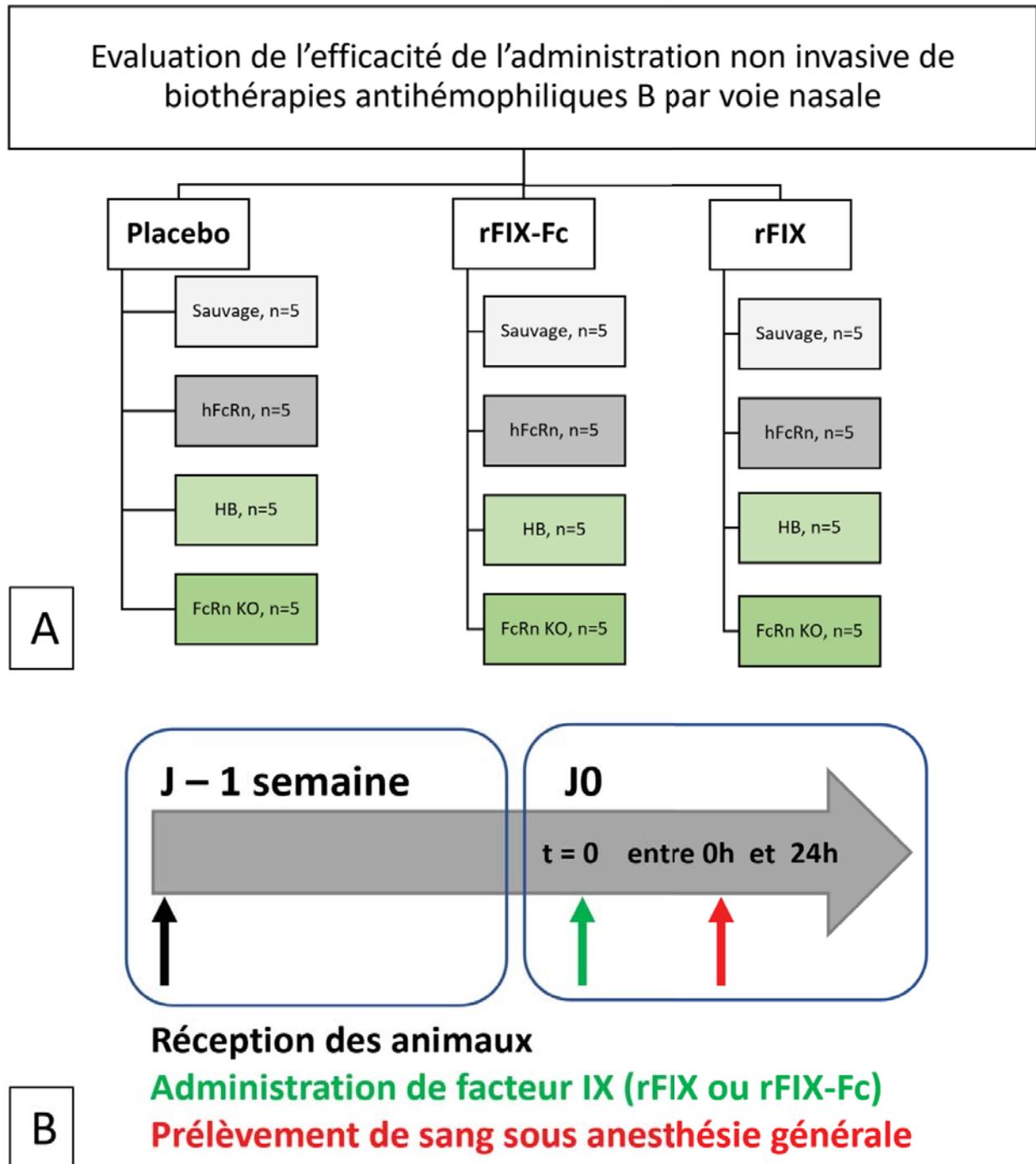
Pour veiller au bien-être animal, les conditions d'élevage, d'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation étaient optimisées pour minimiser douleurs, souffrance et angoisse, telles que l'enrichissement du milieu (copeau de bois, coton et dôme de cellulose) (Décret n° 2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques accessible en ligne : <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000027037840>). Un suivi quotidien des animaux était effectué, permettant ainsi d'augmenter la surveillance (contrôle à 1h et antalgique dans l'eau de boisson) en cas d'altération du comportement (présence d'une courbure du dos) et d'identifier rapidement si un animal avait atteint un des points limites définis ; auquel cas il était profondément anesthésié puis mis à mort par dislocation cervicale.

Le rFIX et le rFIX-Fc dont il est nécessaire de mesurer la demi-vie ont déjà été testés chez l'Homme. L'administration par voie nasale de ces FAH pourrait transitoirement générer un mal-être de l'animal, mais il est prévu dans le protocole que les souris soient anesthésiées. Une surveillance étroite était ensuite assurée pendant l'heure qui suivait l'administration. Deux points de surveillance qualitatifs (présent ou absent) étaient relevés : agressivité ou courbure du dos, car ils sont des signes indirects francs d'une souffrance de l'animal. Une augmentation de la surveillance (contrôle à 1h) avec ajout d'antalgique dans l'eau de boisson (paracétamol à la dose de 50mg/kg dans l'eau de boisson) était d'abord réalisée. La surveillance était maintenue (contrôle à 1h à nouveau) si amélioration, en l'absence de modification de l'état, l'animal était mis à mort par dislocation cervicale.

Les animaux étaient hébergés en groupe (2 à 6 par cage), et avaient à leur disposition de la litière, de l'eau et de la nourriture à volonté. L'équipe était à même de reconnaître et de détecter les signes de douleur chez une souris pour pouvoir agir précocement afin de maintenir son bien-être. Pour limiter le stress durant l'hébergement, les paramètres environnementaux étaient contrôlés pour une réponse uniforme sans appauvrir le milieu. Ainsi, un temps d'acclimatation, un entraînement des animaux à la manipulation, et le moins possible de changement d'expérimentateur en favorisant un travail dans le calme. Les anesthésiques utilisés dans les procédures étaient soit sous forme gazeuse (3min, isoflurane 4%) pour les administrations nasales de FAH, soit par injection intrapéritonéale de 90 µl d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (20 mg/kg) pour les exsanguinations. L'atteinte d'un des points limites conduisait à la mise à mort immédiate de l'animal par dislocation cervicale.

#### 4.4. Nombre d'animaux nécessaires

Le nombre d'animaux utilisés a été réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique des expérimentations. En raison des délais nécessaires à l'acceptation d'un protocole d'expérimentation sur l'animal, un projet ambitieux, regroupant de multiples procédures a été rédigé et accepté, totalisant sur 5 ans 2400 souris (300 reproducteurs pour créer des lignées et 2100 souris pour les expérimentations). Seule la procédure correspondant à l'étude de l'administration du FIX par voie nasale, totalisant 210 souris sera décrite dans ce manuscrit. Il y avait 3 groupes de traitement (le rFIX-Fc, le rFIX et un placebo), 4 lignées de souris pour obtenir des données sur le rôle du FcRn (sauvage, hFcRn, FcRn KO et HB), 5 souris par lignée et 3 temps d'analyse étaient prévus pour l'analyse du passage transmuqueux et des données de PK/PD ( $3 \times 4 \times 5 \times 3 = 180$ ). Les souris sauvages servaient de témoins négatifs, les souris KO pour le FcRn murin (FcRn KO) à évaluer le caractère FcRn-dépendant, les souris humanisées (hFcRn) à se rapprocher des conditions PD humaines, et les souris HB pour tester l'efficacité des FAH. Le flow-chart avec la répartition des souches, des conditions et des traitements est synthétisé dans la **Figure 61** pour un seul temps d'analyse cinétique (e.g. 15 minutes). Trois analyses étaient prévues (15min, 4h et 24h), c'est donc bien  $60 \times 3 = 180$  souris qui étaient nécessaires pour les études PK/PD. Ensuite, une fois obtenues les données de PK/PD, un test d'efficacité sur la coagulation était prévu par dosage chromogénique permettant de confirmer l'activité du facteur après passage transmuqueux. Trois groupes de traitement (placebo, rFIX, rFIX-Fc), avec cinq souris par groupe pour chacune des deux lignées (HB et sauvage) avec un temps d'analyse étaient nécessaires ( $3 \times 5 \times 2 \times 1 = 30$ ).



**Figure 61. Synthèse des différents groupes et molécules thérapeutiques évalués**

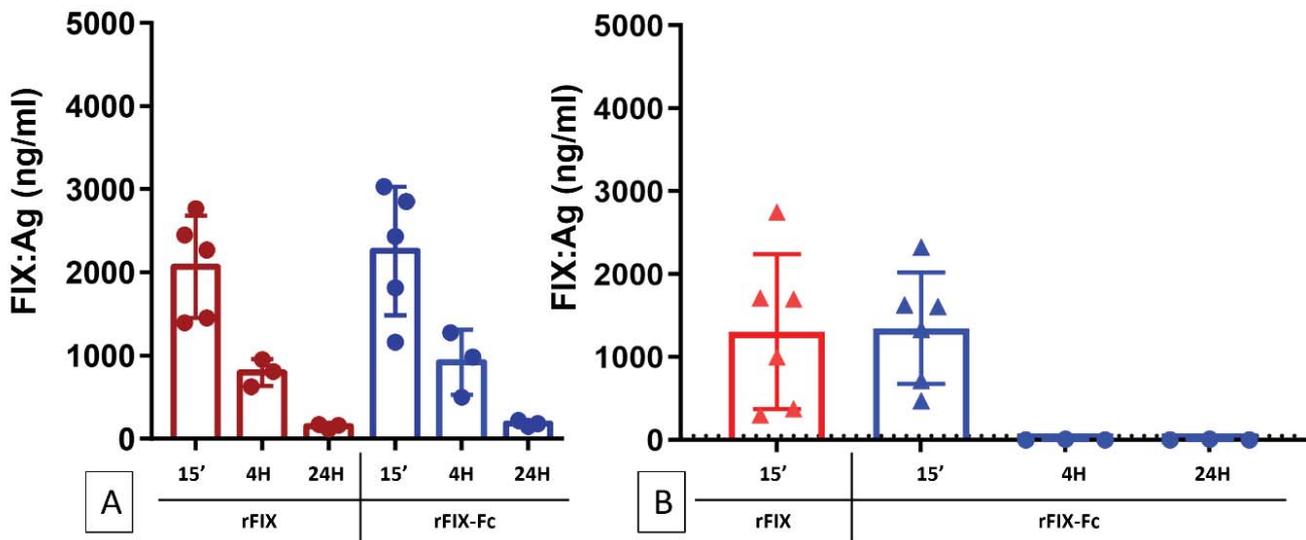
Deux molécules thérapeutiques étaient testées, le rFIX-Fc (Alprolix®) et le rFIX (Idelvion®) versus placebo. 4 lignées de souris ont été utilisées, des souris sauvages et 3 lignées de souris génétiquement modifiées, humanisées pour le FcRn (hFcRn), Knock out pour le FcRn (FcRN KO), et déficiente pour le FIX (FIX KO ou HB). L'effectif est donné pour un temps d'analyse, par exemple à 15 minutes. Le nombre total de souris nécessaire était donc de 180 car il y avait 3 temps d'analyses (15 minutes, 4h et 24h). A cela, il fallait rajouter 30 souris pour l'étude de l'activité du FIX (FIX :C), soit 210 souris au total.

Source : protocole soumis au CECCAP et approuvé par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche, voir chapitre 5 de l'Axe 3.

Finalement, après avoir évalué le temps d'analyse par voie IV et IN sur des souris sauvages (**Figure 62**), une seule analyse cinétique a été choisie pour le reste des expériences (15min), qui ont porté finalement sur 101 souris. En effet, à 4h et à 24h, après administration par voie IV, la décroissance des taux plasmatiques était très rapide et les niveaux plasmatiques de rFIX et rFIX-Fc détectés étaient faibles à 4h et 24h (**Figure 62A**). De la même façon, après administration IN, aucun facteur n'était identifié avec la méthode d'administration initiale testée, donc la mise au point a été poursuivie avec des analyses à 15 minutes (**Figure 62B**).

Un minimum de trois individus par groupe avait été fixé pour respecter le principe de réduction et de raffinement, ce qui permet d'avoir des résultats statistiquement fiables et exploitables avec des tests simples de statistiques descriptives (moyenne, écart-type) et comparatives (tests non-paramétriques si le nombre de souris par groupe était inférieur à 5 (test U de Mann-Whitney ou test de Dunnett's (ANOVA) suivi d'un test de comparaison multiple pour recherche d'une significativité statistique)). Comme il est préférable de prévoir une marge d'erreur, un nombre de cinq souris par groupe était prévu, si jamais l'une d'elles venait à être écartée pour des raisons de souffrance. L'utilisation des résultats préliminaires de PD et PK permettait pour les tests d'efficacité de réduire le nombre de souches murines. Ainsi, les tests d'efficacité n'étaient prévus que sur souris sauvages ou hémophiles et uniquement à un temps d'analyse ce qui permettait de réduire le nombre de souris nécessaires.

### Dosage ELISA rFIX (FIX:Ag)



**Figure 62. Analyse pharmacocinétique après administration par voie intraveineuse**

En ordonnée, la concentration plasmatique en FIX ; et en abscisse, les différentes conditions testées lors des étapes de mises au point. Le tableau sous le graphe résume les différentes conditions. La première ligne indique les temps d'analyse (15 minutes, 4h et 24h), la deuxième ligne du tableau indique la molécule testée (rFIX ou rFIX-Fc).

## 4.5. Efficacité du passage transmuqueux

### 4.5.1. Protocole de la procédure

L'objectif était de déterminer les propriétés PK et PD *ex vivo* après administration intranasale de FIX. La procédure se déroulait en 3 étapes. Premièrement l'animal était pesé, puis anesthésié dans une boîte d'induction gazeuse à l'isoflurane (4%), puis l'anesthésie gazeuse était entretenue au masque (Figure 63).



**Figure 63.** Photo des souris maintenues anesthésiées grâce à des masques faciaux

Une fois la souris anesthésiée, 10 $\mu$ L de PBS, de rFIX ou de rFIX-Fc par narine étaient déposés sous forme d'un goutte à goutte à l'entrée de la narine, permettant à la souris en décubitus dorsal de maintenir une respiration régulière sans expulser le produit ou l'ingérer (Figure 64). Une inhalation réflexe permettait la diffusion au sein des voies aériennes supérieures de façon satisfaisante et la souris était ensuite replacée dans sa cage en décubitus latéral.



**Figure 64.** Photo d'une administration nasale par goutte à goutte sur souris anesthésiée

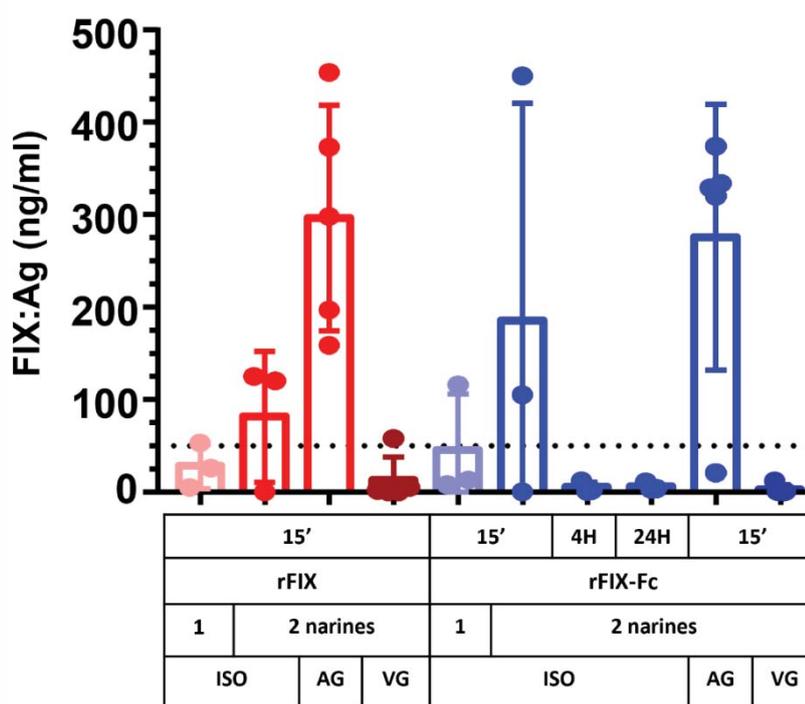
Enfin le prélèvement de sang était réalisé selon les différents temps post-administration préalablement définis, à 15 minutes, 4h et 24h. Pour les prélèvements sanguins, les souris étaient anesthésiées par injection par voie intrapéritonéale de 90  $\mu$ L d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (20 mg/kg) pour obtenir une sédation et un effet analgésique. Le volume de sang total nécessaire était d'1,5mL pour obtenir un volume de plasma après centrifugation suffisant pour les analyses PK/PD. Ce volume de sang correspond presque au volume de sang total d'une souris de 25g, une exsanguination était donc nécessaire car chaque souris ne permettait l'analyse que d'un seul temps d'administration.

Avant l'exsanguination, la profondeur de l'anesthésie était vérifiée attentivement par pincement des pattes (test du retrait) et du bout de la queue. En fin de protocole, les animaux étaient tous mis à mort directement par dislocation cervicale. À ce stade, il était possible de prélever le cerveau et l'épithélium nasal de chaque animal afin de réaliser les études histologiques. Son transport à travers les différentes strates de la muqueuse, sa prise en charge cellulaire et le recrutement de cellules immunitaires (immunité innée et adaptative) pouvaient être évalués par histologie et immunohistochimie des coupes de muqueuses.

#### 4.5.2. Mise au point de l'administration nasale

Plusieurs méthodes d'administration nasale ont été réalisées. L'administration avec une ou deux narines, avec souris vigile (VG), anesthésiée à l'isoflurane seul (ISO) ou après une anesthésie générale complète par injection intrapéritonéale (AG) et les résultats en termes de concentration plasmatique étaient plus consistants dans le groupe AG (**Figure 65**). Pour la suite des expériences, les souris étaient donc d'abord contentionnées pour permettre l'injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine et xylazine permettant d'obtenir une sédation complète et un effet antalgique. Ensuite l'administration nasale était réalisée avec 10 $\mu$ L par narine comme prévu précédemment. En effet, des essais avec une seule narine ont été réalisés mais ils furent infructueux. Enfin, concernant la mise au point du prélèvement sanguin : comme décrit précédemment, une exsanguination était nécessaire pour permettre de récupérer un volume sanguin suffisant sans déclencher la cascade de la coagulation lors du prélèvement et en respectant le bien-être animal. La ponction intracardiaque, méthode recommandée pour l'exsanguination, ne permettait pas de récupérer suffisamment de sang et un avenant au CECCAP a été rédigé pour permettre la validation d'une méthode dérogatoire, ainsi les souris étaient exsanguinées après décapitation ce qui permettait de récupérer le volume nécessaire en un temps très court. La coagulation n'avait ainsi pas le temps de se mettre en place.

#### Dosage ELISA rFIX (FIX:Ag)



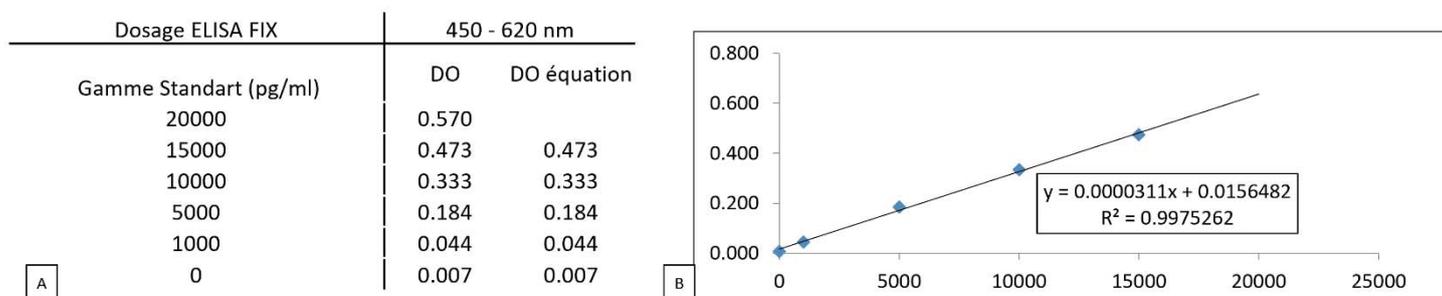
**Figure 65. Analyse pharmacocinétique après administration par voie IN : mise au point**

En ordonnée, la concentration plasmatique en FIX ; et en abscisse, les différentes conditions testées lors des étapes de mise au point. Le tableau sous le graphe résume les différentes conditions. La première ligne indique les temps d'analyse (15 minutes, 4h et 24h), la deuxième ligne du tableau indique la molécule testée (rFIX ou rFIX-Fc), la troisième ligne si l'administration nasale était faite dans une seule narine ou les deux narines et enfin la dernière ligne du tableau indique les modalités d'anesthésie avant l'administration nasale. Il y avait 3 groupes : anesthésie gazeuse à l'isoflurane (ISO), l'anesthésie générale par injection intrapéritonéale (AG) et l'administration sous contention vigile (VG). Les résultats sont exprimés en ng/ml. La ligne de pointillés correspond à l'objectif cible, c'est-à-dire un taux résiduel > 50ng/ml, ce qui correspond à un FIX :C > 1 UI/dL, c'est-à-dire une hémophilie non sévère.

### 4.5.3. Dosage plasmatique du FIX (ELISA)

L'objectif thérapeutique chez l'Homme est de maintenir le taux résiduel de FIX  $> 1\%$ . Les données de PK/PD connues concernent les administrations par voie IV. Ainsi lorsqu'on administre 100UI/kg en IV à un adulte, 5 minutes après administration, FIX :C = 80%, c'est-à-dire 80UI/dL. Donc la correspondance entre la quantité de médicament administré et la concentration plasmatique après administration est la suivante : 100UI/dL = 5 $\mu$ g/ml = 5000pg/ml. Lorsqu'on administre 100UI/kg à une souris de 30g, cela correspond à 3UI de FIX à administrer par voie IV et à 5 minutes, on devrait récupérer un FIX :C = 80%. Lorsqu'on administre 10UI à une souris par voie IN, les données préliminaires issues d'expérience non publiées de la même équipe suggéraient un FIX :C = 6%. La mise au point de l'administration IN décrite précédemment a permis d'améliorer ces résultats (FIX :C  $> 50\%$  à 15 min). Les taux plasmatiques d'antigène FIX ont été quantifiés à l'aide d'un kit ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) nommé Asserachrom® IX :Ag (Stago, New Jersey, USA) selon les instructions du fabricant. Le test ELISA mesure la concentration d'antigène FIX dans un échantillon par la quantité de FIX qui se lie à des Ac cibles dirigés contre le FIX humain. Pour le test ELISA, les Ac disponibles dans le kit ont été développés en interne par Stago (Ac de lapin (Ab) dirigés contre le FIX humain). Un standard a été préparé en diluant du plasma citraté humain avec une concentration connue de FIX (5 $\mu$ g/ml) (réactif 6 (R6) du kit) à des concentrations comprises entre 5 et 5000 ng/mL. Le complexe FIX-Ab de lapin est ensuite détecté à l'aide d'un Ac conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) qui reconnaît le FIX. L'Ac conjugué à la HRP a été détecté à l'aide d'un réactif substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) développé en interne par Stago. Le test est spécifique du FIX humain. La densité optique (DO) est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm. Tous les échantillons présentant des DO inférieures ou supérieures aux limites de la gamme standard étaient exclus des analyses, et une nouvelle analyse était réalisée avec une dilution plus appropriée à l'aide du R4 (tampon de dilution du kit) (**Figure 66**). Le protocole complet est disponible en annexe (**Annexe 14**).

La préparation des dilutions de la gamme étalon (R6), des contrôles positifs (R7) et des échantillons issus des plasmas murins est présentée ci-contre : i/ Gamme : de 20 000 pg/ml à 0 pg/ml en 6 points à partir de la solution mère reconstituée selon les recommandations du fournisseur : S1 (solution mère) = 20,4 $\mu$ L R6 + 1ml de R4 = [98 000 pg/ml] ; ii/ Contrôle : Après la préparation d'une solution S1 (20 $\mu$ L de R7 + 1ml de R4 = 1ml à 1/51<sup>e</sup>), une dilution au 1/204<sup>e</sup> et au 1/2040<sup>e</sup> était préparée correspondant, respectivement au contrôle positif haut et bas. Le contrôle négatif était du tampon mis à disposition par le fournisseur (R4) ; et, iii/ Echantillons : Pour les modèles murins ayant bénéficié d'une administration IV, une dilution au 1/500<sup>e</sup> était réalisée, et pour ceux ayant bénéficié d'une administration IN, une dilution au 1/10<sup>e</sup> était réalisée pendant la période de mise au point, puis au 1/500<sup>e</sup> une fois la technique d'administration validée.



**Figure 66. Courbe de densité optique permettant d'estimer la concentration plasmatique en FIX**  
 (A) Les valeurs de la gamme selon les dilutions préparées et les DO correspondantes mesurées à 450nm ; (B) La régression linéaire entre la concentration en abscisse et les DO en ordonnée pour définir l'équation de la droite permettant d'estimer la concentration plasmatique en FIX de chaque échantillon.

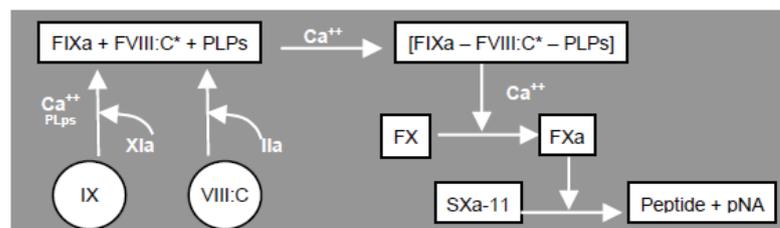
#### 4.5.4. Expression protéique du FIX (western blot)

La visualisation du FIX par western blot a été réalisée selon le protocole décrit ci-dessous. Les échantillons de plasma étaient d'abord décongelés puis dilués dans du PBS au 100<sup>e</sup> puis une deuxième dilution était réalisée pour être à 10µg de protéines sous 30µL. Ensuite, le tampon de *Laemmli Sample Buffer* (LSB) 4X était préparé (900µl LBS4X + 100µl de βmercaptoéthanol + 10µL d'échantillon). Ces derniers étaient ensuite chauffés à 96°C puis refroidis à température ambiante. Le protocole standard de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide utilisé est en annexe (**Annexe 15**). Les échantillons de plasma murin ont été déposés sur un gel Mini-Protean TGX 4-15% (Biorad™) pour l'électrophorèse dans des conditions réductrices puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot Turbo Mini 0,2µm NC Transfer pack, Biorad). La membrane de nitrocellulose a ensuite été saturée avec du lait écrémé-PBS à 6 %. Après l'étape de saturation, la membrane a été incubée avec une solution d'anticorps pendant une heure, puis lavée trois fois 10 minutes en tampon PBS/Tween 20 à 0.05%. L'anticorps primaire utilisé était une IgG de chèvre anti-FIX humain (1mg/mL) purifiée et conjuguée à la HRP (Stago ref 90488) dilué à 1µg/ml en PBS-lait 1%. La membrane a ensuite été lavée trois fois dans du tampon PBS/Tween et les bandes correspondantes aux protéines ont été détectées à l'aide du substrat d'électrochimiluminescence (ECL). Ce dernier est un substrat chimiluminescent non radioactif très sensible, à base de luminol renforcé pour la détection de la peroxydase de raifort (HRP). Il détecte des quantités d'antigène de l'ordre du picogramme et, grâce à l'utilisation de méthodes photographiques visualise l'antigène.

#### 4.5.5. Activité du FIX (dosage chromogénique)

En raison d'un nombre important de couples automates/réactifs, il existe une variabilité inter-laboratoire à l'origine d'une difficulté de standardisation des dosages chromométriques, encore plus importante avec les EHL-rFIX. Cette variabilité pouvant entraîner des sous-estimations de 20 à 50% de la concentration en facteurs (résultats d'étude sur le FVIII) par rapport à la méthode chromogénique, méthode de référence de la pharmacopée européenne (Pouplard *et al.* 2019), bien qu'une variabilité existe aussi pour cette dernière. Cela impose qu'une technique assortie de réactifs validés soit préconisée pour chaque dosage de FIX :C en fonction de la technique d'allongement de la demi-vie utilisée (Pouplard *et al.* 2019; H. V. Wilmot, Hogwood, et Gray 2014; Helen V. Wilmot et Gray 2018).

Pour ce travail, la détermination *in vitro* de l'activité du FIX sur plasma citraté a été réalisée à l'aide du kit Biophen FIX (Hyphen BioMed, Neuville-sur-oise, France) qui utilise la méthode chromogénique. L'objectif était de mesurer la quantité de FIX non activé mais activable présent dans le plasma des modèles murins. Les dilutions choisies pour les échantillons étaient de 1/100<sup>e</sup> et 1/1000<sup>e</sup> et deux gammes (haute et basse) ont été utilisées, protocole disponible en annexe (**Annexe 16**). Le principe est simple, en présence de PLs et de calcium, la coagulation débute permettant l'activation du FX en FXa selon schéma ci-contre (**Figure 67**). C'est le FXa qui va hydrolyser le substrat chromogène libérant de la parantiroaniline (pNA). La quantité de pNA libérée dont la DO sera mesurée à 405 nm qui va permettre d'estimer l'activité du FIX présent dans l'échantillon (la quantité de pNA est directement proportionnelle à la concentration en FIX).



**Figure 67. Représentation schématique de la méthode chromogénique**

Source : Datasheet du kit Biophen™

## 5. Accord du comité scientifique et éthique



**MINISTÈRE  
DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPÉRIEUR,  
DE LA RECHERCHE  
ET DE L'INNOVATION**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

Service de la performance, du financement et de la contractualisation avec les organismes de recherche

Département des pratiques de recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des Fins Scientifiques - AFIS

Affaire suivie par : V. Delassault et V. Gomez

Tél : 01 55 55 97 27 / 77 58

Mél : [autorisation-projet@recherche.gouv.fr](mailto:autorisation-projet@recherche.gouv.fr)

1, rue Descartes  
75231 Paris SP 05

**Direction générale  
de la recherche et de l'innovation**

Paris, le 6 mai 2022

### Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

1. référencé sous le numéro APAFIS #36194-2022010421473996 v7
2. ayant pour titre : Efficacité et toxicité après administration buccale et nasale de biothérapies anti-hémophiliques A et B chez des souris
3. déposé par l'établissement utilisateur : PLATEAU DE BIOLOGIE EXPERIMENTALE (PBES) - ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON, numéro d'agrément D691230303, dont le responsable est Monsieur Jean-François PINTON
4. et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale et de la conformité à l'autorisation est assurée par : Madame Claire MONGE, Monsieur Maxime FIEUX, Madame Sandra LE QUELLEC,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement, pour une durée de 5 ans à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°015 et a reçu un avis favorable.

Ce projet n'est pas soumis à l'obligation d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation.

Pour la ministre et par délégation  
le chef du département des pratiques  
de recherche réglementées

Laurent PINON

Monsieur Jean-François PINTON  
PLATEAU DE BIOLOGIE EXPERIMENTALE (PBES) - ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON

## 6. Revue systématique sur le FcRn et l'administration nasale des biothérapies

Cette étude a permis de supporter scientifiquement le projet de développement de l'administration nasale de facteur de la coagulation dans l'hémophilie qui a été déposé pour l'obtention de la bourse de la SFORL & CCF en 2020 pour lequel j'ai été lauréat. Les résultats des expériences menées grâce à ce financement sont détaillés dans le chapitre 7.

### Résumé Français de l'article

Le FcRn joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie des Ig, mais il est également capable de transporter des biothérapies à travers les barrières cellulaires. Son implication dans le transport de biothérapies par voie nasale est d'un intérêt particulier car elle permettrait une stratégie moins invasive que les administrations sous-cutanées, intramusculaires ou IV, qui sont souvent utilisées dans la pratique clinique. Une revue systématique a été réalisée conformément aux lignes directrices *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). Elle a été enregistrée dans le registre international des revues systématiques (PROSPERO), ce qui a permis d'identifier les articles répondant aux critères d'inclusion. Les études cliniques et précliniques portant sur les FcRn et l'administration de biothérapies par voie nasale ont été examinées, et le risque de biais a été évalué pour l'ensemble des études à l'aide d'un outil d'évaluation, l'*Oral Health Assessment Tool* (OHAT). Les tableaux de synthèse sont présentés dans l'article joint. Parmi les 12 études finalement incluses dans cette revue systématique (sur les 758 études examinées), 11 ont démontré une transcytose efficace des biothérapies à travers l'épithélium nasal, et 6 ont confirmé l'expression au niveau nasal du FcRn. Seules trois études ont évalué la toxicité potentielle de l'administration IN de ces biothérapies, et elles ont toutes montré qu'elles étaient sans danger sur l'épithélium. Cette revue systématique a confirmé que le FcRn est exprimé au sein de l'épithélium nasal *ex vivo* chez l'Homme et chez le porc (mesure de l'ARNm du FcRn et de la protéine au sein de culture cellulaire dérivées de l'extraction de tissus *in vivo*), et *in vivo* sur modèles murins (méthodes immunohistochimiques). Le rôle du FcRn dans la transcytose des IgG et/ou des molécules dérivées des IgG à travers l'épithélium des voies aériennes a été mis en évidence au sein de modèles de vaccination. L'utilisation de souris FcRn KO ont permis aux auteurs de souligner l'importance du FcRn dans l'immunisation induite après administration intranasale. Le rôle du FcRn a également été mis en évidence dans l'administration cérébrale de biothérapies administrées par voie nasale. En effet, les auteurs rapportent des concentrations importantes au sein du système nerveux centrale et dans les bulbes olfactifs après administration d'IgG IN. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser les propriétés PK et PD des biothérapies après leur administration par voie IN, le détail de la discussion est présenté dans la revue publiée jointe.



Review

# FcRn as a Transporter for Nasal Delivery of Biologics: A Systematic Review

Maxime Fieux<sup>1,2,3,4,\*</sup> , Sandra Le Quellec<sup>2,5,6,7</sup>, Sophie Bartier<sup>3,4,8</sup>, André Coste<sup>3,4,9</sup>, Bruno Louis<sup>3,4</sup>, Caroline Giroudon<sup>10</sup>, Mikail Nourredine<sup>2,11,12</sup> and Emilie Bequignon<sup>3,4,9</sup>

- <sup>1</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Service d'ORL, D'otoneurochirurgie et de Chirurgie Cervico-Faciale, Pierre Bénite, CEDEX, F-69495 Lyon, France
- <sup>2</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69003 Lyon, France; sandra.le-quellec@chu-lyon.fr (S.L.Q.); mikail.nourredine@chu-lyon.fr (M.N.)
- <sup>3</sup> Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, F-94010 Créteil, France; sophiebartier@hotmail.fr (S.B.); andre.coste@chicreteil.fr (A.C.); bruno.louis@inserm.fr (B.L.); emilie.bequignon@gmail.com (E.B.)
- <sup>4</sup> CNRS ERL 7000, F-94010 Créteil, France
- <sup>5</sup> Hospices Civils de Lyon, Hôpital Cardiologique Louis Pradel, Unité D'hémostase Clinique, CEDEX, F-69500 Bron, France
- <sup>6</sup> EA 4609 Hémostase et Cancer, Université Claude Bernard Lyon 1, F-69372 Lyon, France
- <sup>7</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Service D'hématologie Biologique, CEDEX, F-69500 Bron, France
- <sup>8</sup> Hospices Civils de Lyon, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Service D'hématologie Biologique, CEDEX, F-69500 Bron, France
- <sup>9</sup> Service d'ORL, de Chirurgie Cervico Faciale, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, F-94010 Créteil, France
- <sup>10</sup> Hospices Civils de Lyon, Service de la Documentation Centrale, CEDEX, F-69424 Lyon, France; caroline.giroudon@chu-lyon.fr
- <sup>11</sup> Hospices Civils de Lyon, Service de Biostatistique et Bioinformatique, F-69003 Lyon, France
- <sup>12</sup> CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive UMR 5558, F-69100 Villeurbanne, France
- \* Correspondence: maxime.fieux@chu-lyon.fr; Tel.: +33-4-7266-6415



**Citation:** Fieux, M.; Le Quellec, S.; Bartier, S.; Coste, A.; Louis, B.; Giroudon, C.; Nourredine, M.;

Bequignon, E. FcRn as a Transporter for Nasal Delivery of Biologics: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6475. <https://doi.org/10.3390/ijms22126475>

Academic Editor: Markus Biberger

Received: 10 May 2021

Accepted: 11 June 2021

Published: 17 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** FcRn plays a major role in regulating immune homeostasis, but it is also able to transport biologics across cellular barriers. The question of whether FcRn could be an efficient transporter of biologics across the nasal epithelial barrier is of particular interest, as it would allow a less invasive strategy for the administration of biologics in comparison to subcutaneous, intramuscular or intravenous administrations, which are often used in clinical practice. A focused systematic review was conducted following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines. It was registered on the international prospective register of systematic reviews PROSPERO, which helped in identifying articles that met the inclusion criteria. Clinical and preclinical studies involving FcRn and the nasal delivery of biologics were screened, and the risk of bias was assessed across studies using the Oral Health Assessment Tool (OHAT). Among the 12 studies finally included in this systematic review (out of the 758 studies screened), 11 demonstrated efficient transcytosis of biologics through the nasal epithelium. Only three studies evaluated the potential toxicity of biologics' intranasal delivery, and they all showed that it was safe. This systematic review confirmed that FcRn is expressed in the nasal airway and the olfactory epithelium, and that FcRn may play a role in IgG and/or IgG-derived molecule-transcytosis across the airway epithelium. However, additional research is needed to better characterize the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of biologics after their intranasal delivery.

**Keywords:** neonatal Fc receptor; monoclonal antibody; immunoglobulin G; Fc-fusion protein; transcytosis; nasal route; biologics

## 1. Introduction

The neonatal receptor for the Fc fragment of immunoglobulin (Ig) G (FcRn) was discovered in the 1980s [1]. It is a transporter of maternal immunoglobulin G (IgG) to the foetus during gestation (humans, rodents), as well as through breast milk during the neonatal period (rodents) [2–5]. However, more recent studies have demonstrated that FcRn is rather ubiquitous and is expressed throughout life [6–8]. FcRn is expressed in endothelial cells and haematopoietic cells, as well as in airway epithelial cells, including human nasal epithelial cells (HNECs) [9,10], alveolar epithelial cells [11–14] and porcine olfactory mucosa [15,16]. FcRn plays a major role in regulating immune homeostasis in adults and in regulating the half-life of IgG by protecting it from degradation using a recycling mechanism [17–19]. Moreover, FcRn impacts the biodistribution of IgG-like monoclonal antibodies (mAbs); it transports antibodies across the cellular barrier [6–8,11,12,20–26] and delivers IgGs across mucosal surfaces to confer protective immunity [27–33]. The role of FcRn in the transport of molecules in epithelial cells has been extensively analyzed [11,12,22–25,34,35]. IgG binding to FcRn occurs with the highest affinity at the acidic pH (pH 5–6) found in endosomes, and with the lowest affinity at neutral pH (pH 7.4), thereby allowing for cell-surface dissociation in the plasma [36,37]. Interestingly, a pH of approximately 6 is also found at the apical cell surface of various mucosal layers [38]. More recently, it has been shown that FcRn also regulates the homeostasis of albumin [39]. Of note, the binding site for albumin on FcRn is different from the one for IgG [40,41]; hence, they do not compete with each other for FcRn binding.

Since the introduction of hybridoma technology by Köhler and Milstein, some of the most important biologics that have been developed are IgG-derived antibodies (Abs) [42,43]. FcRn-mediated transport can be used for the delivery of therapeutic Abs or other types of biologic following various administration routes [44,45]. In 2012, a study showed that bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>; Roche, Bâle, Suisse) was able to cross two subtypes of porcine mucosa: one mucosa obtained from the septum and the other one obtained from the snout cavity. The author supposed this was due to FcRn-mediated transport of IgG-derived molecules through the epithelium [46]. This study opened the door for the use of intranasal delivery of biologics. However, although FcRn expression and its role in IgG transport were characterized in the lower airways in the early 2000s [11–14,47], FcRn expression in the upper airways has not yet been clearly identified [10]. Additional studies are required to identify the directionality of FcRn-mediated IgG transport in the nasal epithelium. In humans, intranasal delivery of insulin has been shown to induce a positive effect on memory and metabolic effects via the hypothalamic–pituitary axis [48–52]. Whether the nose-to-brain pathway is also navigable for proteins with a higher molecular weight, such as Abs, remains to be determined. Balin et al. demonstrated that horseradish peroxidase was detectable in the olfactory bulb of rodents and monkeys within 45 to 90 min after intranasal delivery [53], thus suggesting that axons of olfactory neurons may represent a pathway to the brain for protein drugs such as Abs [54]. However, several questions remain to be addressed with regard to the intranasal delivery of biologics. Although it has been shown that biologics are rapidly efficient after intranasal delivery [55], their bioavailability has not yet been completely solved. In addition, the generation of micron-sized aerosol droplets can have tremendous effects on proteins. The shear stress occurring during aerosol formation can induce the formation of unfolded proteins or protein aggregation [56–60], with a subsequent decrease in biological efficiency and immune side effects [61]. Therefore, it is of great importance to further study the behaviour of biologics after their intranasal delivery in various preclinical models.

The current review will be the first to specifically discuss the use of FcRn in the transcytosis of biologics after intranasal delivery. This review is a prerequisite to further developments of the nasal route for the administration of biologics, which can considerably improve patients' quality of life, especially in those who undergo multiple lifelong intravenous and/or subcutaneous injections for the treatment of chronic diseases.

To address this question, we hereby provide a systematic review of the implications of FcRn in the transport of biologics after intranasal delivery. Systematic reviews tend to be more comprehensive and less biased than other types of literature reviews. They are supposed to be built on a defined protocol that describes the rationale, the hypothesis and the planned method used for drawing theoretical conclusions from the various studies of interest. Therefore, systematic reviews have become an increasingly central pillar of basic science and represent a substantive contribution to knowledge [62], especially as the number of publications increases overtime. To increase the transparency of our review, it was registered in the international prospective register of systematic reviews PROSPERO (CRD42021236019, <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/#recordDetails>, accessed on 8 March 2021), following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines [63,64]. In addition, the risk of bias for each study selected was assessed using the Oral Health Assessment Tool (OHAT) [65,66], which has been developed for evaluating the internal validity of studies [65–67].

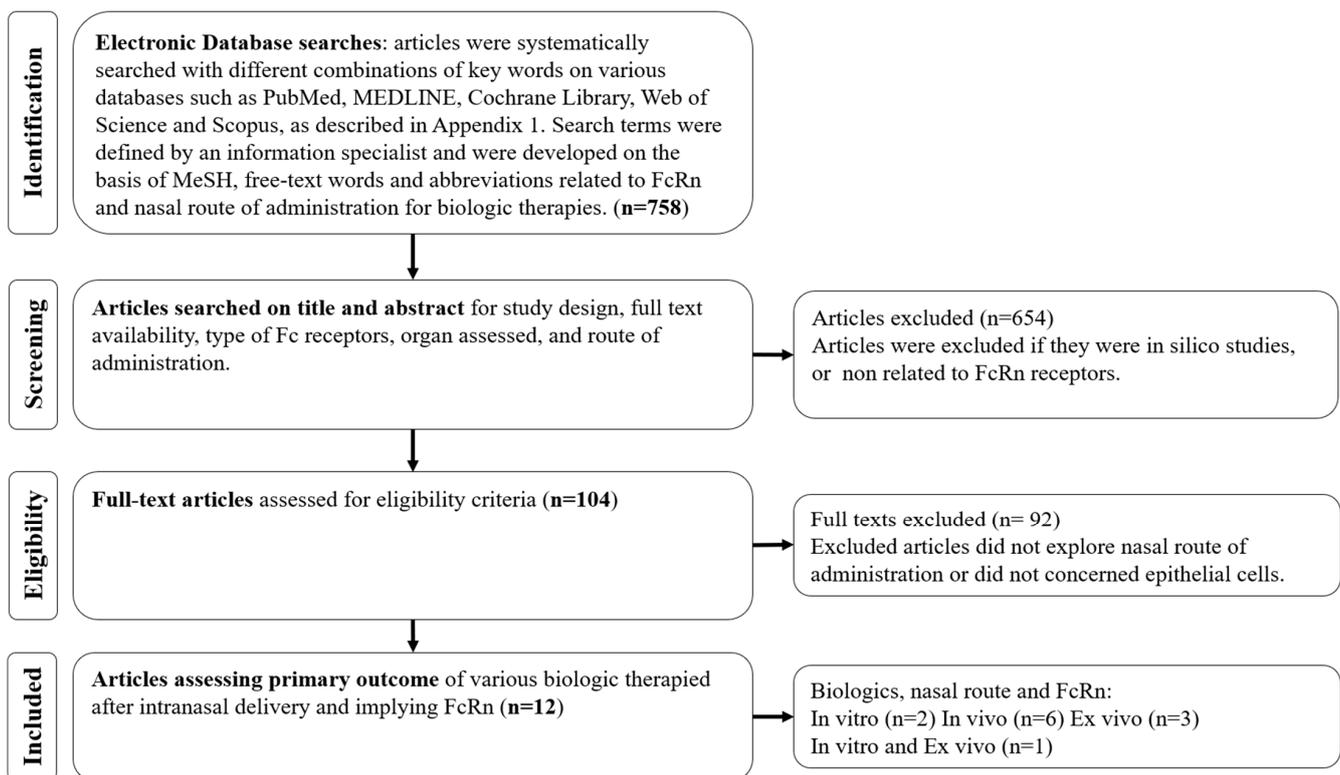
In this review, the recorded outcomes were the effects of biologics after nasal administration following FcRn-mediated transcytosis across the epithelium. In vivo studies were more specifically investigated for pharmacokinetic (absorption, distribution, metabolism, elimination, transcytosis efficiency, time and plateau effect), pharmacodynamic (dose-effect response and drug activity) and toxicity (cellular viability, epithelial permeability, cell differentiation, ciliary analysis) outcomes. In vitro studies were investigated for pharmacokinetic (transcytosis efficiency, time effect, plateau effect and repeated administration effect), pharmacodynamic (dose-effect response and drug activity) and toxicity (cellular viability, epithelial permeability, cell differentiation and ciliary analysis) outcomes. Studies reporting any other types of outcome were excluded.

## 2. Methods

This systematic literature review was conducted and reported in line with criteria stipulated by the PRISMA recommendations [63,64]. Literature monitoring was performed regularly until 25 April 2021. Our eligibility criteria included clinical, in vivo and in vitro preclinical studies involving FcRn and nasal delivery of any type of biologic. Eligible articles were original research articles irrespective of their publication date. Clinical studies that were considered for eligibility were randomized or nonrandomized controlled clinical trials, comparative studies and observational studies. Animal and in vitro preclinical studies had to be relevant to human health. Systematic reviews, narrative reviews and single-patient case reports were excluded.

Studies were identified by searching electronic databases such as PubMed (including Medline, the US National Library of Medicine), the Cochrane Library (Wiley), Web of Science (Clarivate Analytics) and Scopus (Elsevier). Additional sources obtained from the reference lists of selected articles were identified. Only English and French language articles were included.

The keywords included and the detailed equations defined by an information specialist from the Lyon University Hospitals Documentation Centre are given in the Supplementary Materials (Supplementary File S1). Study selection was performed as described, using the PRISMA flow diagram (Figure 1) [63], and was conducted using the program Rayyan (Rayyan Systems Inc., Cambridge, MA, USA) [68]. The data were collected (title, author, year, journal, number of references, study type, species, intervention, comparison group, assessment, outcome and risk of bias) and presented in a standardized Microsoft Excel<sup>®</sup> form developed for this systematic review.



**Figure 1.** PRISMA Study Selection Flow Diagram. The PRISMA Flow Diagram demonstrates each phase of the search strategy in which articles were evaluated. During each phase, articles were excluded based on our eligibility criteria. Bold numbers correspond to the number of articles selected after each phase of the search strategy.

The risk of bias was assessed across studies using the OHAT (Supplementary File S2, [65–67]). The OHAT assessed bias in the studies using 11 questions that target selection bias, confounding bias, performance bias, attrition bias, detection bias and selective reporting bias. Only 9 questions were used to assess the bias of in vitro exposure and experimental animal studies. Each question was answered by one out of four levels: definitely low, probably low, probably high and definitely high risk of bias.

The primary outcomes of interest were the effects of biologics after nasal administration and the role of FcRn in epithelial transcytosis within the upper airway system. The results were synthesized based on the reported measures from the included studies. Performing a meta-analysis was impossible because there were no trials using a similar methodology or reporting a similar outcome.

### 3. Results

#### 3.1. Selection, Characteristics and Risk of Bias of the Included Studies

Utilizing our inclusion and exclusion criteria, 12 articles were included [9,10,15,16,26–29,35,46,61,69]. Among these, an in vitro HNEC model was used in one study [9], an in vitro Roswell Park Memorial Institute (RPMI) epithelial model was used in two studies [16,35], an in vivo murine model was used in six studies [26–29,61,69], an ex vivo porcine model was used in 3 studies [15,16,46] and an ex vivo human model was selected in one study [10]. Table 1 describes the general characteristics of the included studies. Additional details about the in vivo and in vitro studies are described in the Supplementary Materials in Supplementary Files S3 and S4, respectively.

**Table 1.** Characteristics of the included studies.

First Author Date	Design	Species	Intervention	Application	Biotherapy Tested	Dose Administered	Concentration	Formulation	Primary Outcome	Blocking FcRn
Rawool [27] * 2008, India	In vivo	Mice FcRn WT	Assess FcRn-mediated mucosal vaccine delivery with an Ft model	Vaccine delivery against Ft	mAb-iFT (fusion of iFT and IgG)	$2 \times 10^7$ iFT/mAB-iFT/F(ab') <sub>2</sub> -iFT organisms	$2 \times 10^7$ CFU/20 $\mu$ L	PBS	FcRn-targeted immunogen enhanced immunogen-specific IgA production and protection against subsequent infection. It is a highly effective vaccination strategy against Ft.	Yes
Lu [28] * 2011, USA	In vivo	Mice FcRn WT and KO	Assess ability of FcRn to deliver Gag-Fc fusion protein in a HIV model	Vaccine delivery against VIH	HIV Gag-Fc fusion protein	20 $\mu$ g	1 mg/mL	PBS	FcRn-targeted mucosal immunization was effective at inducing Gag specific Ab responses in serum or mucosal secretions, and high levels of stable immune memory were obtained.	Yes
Ye [29] * 2011, USA	In vivo	Mice FcRn WT and KO	Assess FcRn-mediated mucosal vaccine delivery with an HSV-2 model	Vaccine delivery against HSV	gD-Fc/wt (HSV-2 gD fused with an IgG Fc fragment)	20 $\mu$ g	1 mg/mL	PBS	Intranasal immunization with an engineered fused protein resulted in complete protection of wild-type, but not FcRn KO, mice that were intravaginally challenged with virulent HSV-2.	Yes
Bitsatksis [69] * 2015, USA	In vivo	Mice FcRn WT	Assess FcRn-mediated mucosal vaccine delivery with an Ft model	Vaccine delivery against Ft	mAb-iFT IC (fusion of iFT and IgG)	$2 \times 10^7$ CFU mAb-iFT IC organisms	NA	PNS	FcRn targeting increases the frequency and activation status of DCs in the lungs of immunized mice and mediates the generation of Ft-specific effector memory CD4 <sup>+</sup> T cells.	No
Kumar [61] * 2018, USA	In vivo	Rats FcRn WT	Assess CNS IgG distribution after intranasal administration	Intracerebral mAb delivery	Radiolabeled Ab: [ <sup>125</sup> I]-IgG Fluorescently labeled Ab: AF488-IgG	50 $\mu$ g to 2.5 mg for [ <sup>125</sup> I]-IgG 0.7 mg for AF488-IgG	1-20-50 mg/mL 30 mg/mL	PBS	[ <sup>125</sup> I]-IgG concentrations in the CNS was higher following intranasal delivery compared to intra-arterial delivery for doses producing similar endpoint blood concentrations.	No

Table 1. Cont.

First Author Date	Design	Species	Intervention	Application	Biotherapy Tested	Dose Administered	Concentration	Formulation	Primary Outcome	Blocking FcRn
Bern [26] * 2020, Norway	In vivo	Mice FcRn WT and KO hFcRn	Assess ability of FcRn for delivery of albumin- based biologics	Haemophilia	Biotinylated albumin (WT, KAHQ or QMP) IgG1 and scFv-Alb	10 to 30 µg for a 10 g mice	20 µL à la dose de 1 mg/kg to 3.2 mg/kg	PBS	Nasal FcRn enabled efficient transcytosis of albumin fusion proteins.	Yes
Röhm [35] * 2017, Germany	In vitro	RPMI cells	Assess IgG quality after transcytosis	Enhancement of IgG permeation rate	mAb HIRMAb 83-14	4 mg	1.4 mg/mL for Fab; 4 mg/mL for IgG	L-arginine, HBC, PS20, sorbitol, trehalose	Aggregation of native IgG was reduced and transepithelial permeation rate was enhanced up to 2.8-fold with the used of specific formulations (F1) for intranasal aerosol-cell delivery.	No
Bequignon [9] * 2019, France	In vitro	HNEC	Assess mAb transcytosis via FcRn	Anti-cancer immunotherapy	Infliximab	12.5 to 1250 ng	50-500-50000 µg/mL	HBSS-MES	Transepithelial passage of therapeutic mAb was dose-dependent.	No
Ladel [16] * 2019, Germany	In vitro  Ex vivo	OEPC and RPMI cells  Porcine olfactory mucosa	Assess permeation rates of IgGs through the nasal mucosae	Anti-cancer immunotherapy	WT pIgG, WT hIgG and DG hIgG (biosimilar of Bevacizumab)	50 µg	1.5 mg/mL	PBS	hIgG permeation was faster than pIgGs over the first four in OEPC ALI cultures, but it converges from 8 h to 48 h. DG hIgG showed a higher permeation rate than WT hIgG in the RPMI ALI model.  hIgG permeation was 12 times higher after 5 h than the one of pIgG. The permeation rate of DG hIgG and WT hIgG did not show differences.	No

Table 1. Cont.

First Author Date	Design	Species	Intervention	Application	Biotherapy Tested	Dose Administered	Concentration	Formulation	Primary Outcome	Blocking FcRn
Samson [46] * 2012, France	Ex vivo	Porcine nasal mucosa	Assess the transport of bevacizumab through porcine nasal mucosa	Rendu-Osler Disease	Bevacizumab	500 µg	25 mg/mL	trehalose, sodium phosphate, PS20, water	Total recovery of intranasally-delivered bevacizumab was 83% of the initial dose, with 53% localized at the mucosal surface and 11% that had gone through the mucosa.	No
Heidl [10] * 2015, Austria	Ex vivo	HNEC	Assess FcRn expression and localization in HNEC	Intranasal administration of mAb	None	NA	NA	NA	FcRn was detected in ciliated and basal cells of the nasal epithelium as well as in vascular endothelial cells and in gland tissue.	No
Ladel [15] * 2018, Germany	Ex vivo	Porcine olfactory mucosa	Assess ability of FcRn to transport IgGs through the nasal lamina propria	Anti-cancer immunotherapy	pIgG and hIgG (biosimilar of Bevacizumab)	8 µg	8 mg/mL	PBS	FcRn is expressed in the olfactory mucosa and enabled the apical uptake of allogeni, and xenogenic IgG in a species-specific manner.	No

\* See Supplementary File S2 for a complete report of the quality evaluation of included studies according to the OHAT for assessing risk of bias. Abbreviations: CFU, Colony Forming Unit; CNS, Central Nervous system; DC, Dendritic Cells; DG, deglycosylated; FcRn, neonatal Fc Receptor; FVII, Factor VII; Ft, Francisella Tularensis; gD, glycoprotein D; hFcRn, human FcRn; HBC, 2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin; hIgG, human IgG; HIV Gag-Fc, fusion of p24 protein from HIV Gag with IgG heavy chain; HNEC, Human Nasal Epithelial Cell; iFt, inactivated Francisella tularensis; KO, knock-out; mAb, Monoclonal Antibody; NA, not available; PS20, Polysorbate 20; PBS, Phosphate Buffer Saline; pIgG, porcine IgG; QMP, triple mutant E505Q/T527M/K573P Albumin engineered; rFVII, recombinant Factor VII; RPMI cells, carcinoma from squamous epithelium obtained from a human nasal septum; scFv-Alb, single-chain variable fragment fused to Albumin; WT, wild-type.

The risk of bias was assessed using the OHAT, even though we analyzed in vivo and in vitro studies (Table 2). The majority of studies using animal models [15,16,26–29,46,61,69] investigated the ability of FcRn to enhance transcytosis ( $n = 8$ , [15,16,26–29,61,69]), while only two investigated the epithelial toxicity of this procedure ( $n = 2$ , [26,46]). In studies performed on human cells [9,10,16,35], three considered transcytosis efficiency [9,16,35] and one considered transcytosis toxicity [9].

**Table 2.** Risk of bias summary using OHAT.

Study	Selection Bias	Performance Bias	Attrition Bias	Detection Bias	Selective Reporting	Other Bias
Rawool [27], 2008	–	–	+	+	+	+
Lu [28], 2011	–	–	+	+	++	+
Ye [29], 2011	–	–	++	++	++	+
Bitsatskis [69] 2015	–	–	++	+	++	+
Kumar [61] 2018	–	–	+	+	+	–
Bern [26] 2020	–	–	++	+	++	+
Röhm [35] 2017	–	–	++	+	++	+
Bequignon [9] 2019	–	–	++	+	++	+
Samson [46] 2012	–	–	++	++	++	+
Heidl [10] 2015	–	–	+	–	+	+
Ladel [15] 2018	–	–	+	+	++	+
Ladel [16] 2019	–	–	+	+	++	+

(–) Definitely high risk; (–) probably high risk; (+) probably low risk; (++) definitely low risk.

### 3.2. Expression of FcRn in the Upper Airway System

Among the 12 studies included in this systematic review, six first confirmed the expression of FcRn in their different models chosen to assess biologic-transcytosis across airway epithelial cells [9,10,15,16,28,29]. Several methods were used to study FcRn expression. Most mouse-based studies assessed FcRn expression in various tissues using immunohistochemical analyses. Mouse FcRn was found to be expressed in the lungs and trachea [28,29] but not in the intestine of adult mice [29]. The expression pattern of FcRn in larger animal models and humans was studied using FcRn mRNA or FcRn protein measurements in cell cultures derived from in vivo tissue extraction [9,10,15,16]. In 2018, Ladel et al. showed that FcRn was expressed in different parts of the porcine regioolfactoria (*concha nasalis dorsalis*, *concha nasalis media*, *ethmoidal turbinates*), as well as in the porcine respiratory epithelium (*concha nasalis ventralis*) [15]. The transcription and expression of the *FCGRT* gene, encoding FcRn, was studied in OEPC and RPMI cells by RT-PCR and Western blots. The results were compared to those obtained from the porcine olfactory mucosa (*concha nasalis media*), which served as a reference [15,16]. There was a trend towards a lower expression level of FcRn in RPMI compared to OEPC [67]. In humans, Heidl et al. was the first to confirm the localization of the FcRn  $\alpha$ -chain in ciliated cells of the epithelium in blood vessels and subepithelial glands using an affinity-purified antibody against the cytoplasmic tail of the FcRn  $\alpha$ -chain in nasal tissue sections [10]. They showed that the steady-state distribution of FcRn was predominantly observed at the basolateral side of ciliated epithelial cells and gland cells. Colocalization of the FcRn  $\alpha$ -chain with IgG or with early sorting endosomes (EEA1-positive), but not with late endosomes/lysosomes (LAMP-2-positive), in ciliated cells was observed. This was indicative of the presence of

FcRn in the recycling/transcytosis pathway but not in compartments involved in lysosomal degradation, supporting the role of FcRn in IgG transcytosis in the nasal epithelium [10].

Bequignon et al. also demonstrated the expression of FcRn in HNECs. High expression of FcRn was found in the cytosol of ciliated, mucus and basal cells [9]. Interestingly, FcRn expression varies depending on the degree of cell differentiation [9].

The other six studies [26,27,35,46,61,69] did not specifically assess FcRn expression. Some of them used cell lines and mouse models that were already known to express FcRn [26,27,69], or the aim of the study was different [35]. In contrast, Samson et al. suggested that FcRn expression might explain bevacizumab permeability through the nasal epithelium, as it can bind IgG. However, FcRn expression in the nasal mucosa was not studied in this paper, and it had not been reported previously at that time [46]. More recently, Kumar et al. showed an AF488-IgG signal in the underlying lamina propria on high magnification confocal imaging of sections from the olfactory epithelium, but did not look at FcRn expression [61].

### 3.3. *Biologics-Transcytosis Efficiency after Intranasal Delivery*

Taken together, the combined expression of FcRn in the endothelium, glands and ciliated nasal epithelial and basal cells, as well as the localization of IgG in these tissues, suggests that FcRn could play a role in IgG transport in the nasal mucosa [10]. Among the 12 studies included in this systematic review, 11 demonstrated efficient transcytosis of biologics through the nasal epithelium [9,15,16,26–29,35,46,61,69]. The biologics that were studied were highly heterogeneous across the studies, as were their doses (Table 1). Most studies focused on immunization following intranasal delivery of biologics [27–29,69], whereas others aimed to characterize FcRn-mediated transport of biologics and their subsequent biodistribution [15,16,26,35,46,61].

Globally, all studies about immunization reported that intranasal delivery of biologics was efficient for inducing an appropriate immune response directed against the pathogen of interest. Some authors studied a fusion of inactivated *Francisella tularensis* (iFt) and IgG, named mAb-iFT, as a model for the Ft vaccine [27,69]. Rawool et al. demonstrated that (i) the FcR-targeted immunogen enhances immunogen-specific IgA production and protection against subsequent Ft infection in an IgA-dependent manner; (ii) both FcγR and FcRn are crucial to this protection; and (iii) iFt, when targeted to FcRs, enhances protection against the highly virulent SchuS4 strain of Ft, a category A biothreat agent. Bitsaktis et al. demonstrated that FcRn targeting increased the frequency and activation status of DCs in the lungs of immunized mice. It mediates the generation of Ft-specific, gamma interferon (IFN-γ)-secreting, effector memory CD4<sup>+</sup> T cells during infection, thus further elucidating the immunological mechanisms involved in enhanced immune protection utilizing this novel mucosal vaccine platform. Furthermore, 100% of the C57BL/6 mice that were immunized with mAb-iFT ICs survived the Ft LVS challenge, while immunization with iFT alone provided only 50% protection.

Other vaccine models were also tested. Gag-Fc fusion protein (fusion of p24 protein from HIV Gag with IgG heavy chain) was used for the HIV vaccine challenge model [28], and gD-Fc/wt (HSV-2 glycoprotein D fused with an IgG Fc fragment) was used to test the effect of glycosylation in the HSV vaccine challenge model [29]. Lu et al. demonstrated that the chimeric Gag-Fc fusion protein was transported efficiently across the mucosal epithelium in mice. Moreover, intranasal immunization induced an immune response sufficiently potent to protect mice from infection with HIV after the intravaginal challenge. Finally, FcRn-targeted immunization induced strong antibody and cellular immune responses to HIV Gag at mucosal and systemic sites [28]. Ye et al. demonstrated that the FcRn/IgG transport pathway can be exploited to greatly enhance the efficacy of mucosal-administered vaccines. The authors identified that FcRn-targeted mucosal immunization differs notably between WT and FcRn KO mice or between gD-Fc/wt and gD-Fc/mut immunized mice in terms of mucosal and systemic immune responses, cytokine expression profiles, the

maintenance of T and B cell memory and long-lived bone marrow plasma cells, and the resistance to infection.

FcRn-mediated transcytosis after intranasal delivery was also studied in applications other than immunization. Radiolabelled Ab ( $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$ ) and fluorescently labelled Ab (AF488-IgG) were used to assess CNS delivery [61]. Kumar et al. demonstrated that intranasal  $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$  consistently yielded the highest concentrations in the olfactory bulbs, trigeminal nerves and leptomeningeal blood vessels, as well as their associated perivascular spaces. Significantly higher  $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$  concentrations were found in the CNS after intranasal delivery than after intra-arterial delivery for doses producing similar endpoint blood concentrations. Importantly, the concentration of  $[^{125}\text{I}]\text{-IgG}$  in the CNS significantly increased in a dose-dependent manner following intranasal administration of increasing doses, from the picomolar range after administration of small doses (50  $\mu\text{g}$ ) up to the nanomolar range after administration of higher doses (1 mg and 2.5 mg). The authors showed that it might be feasible to achieve therapeutic levels of IgG in the CNS, especially when delivering high doses in the nose, and they provided insights about the nose-to-brain pathways the Abs took after intranasal delivery. As mentioned previously, IgG and albumin also bind to FcRn. In this context, Bern et al. assessed the intranasal delivery of wild-type (WT) albumin and engineered albumin, with a specific mutation responsible for a higher binding affinity for FcRn (KAHQ, QMP, and scFv-Alb) [26]. They demonstrated that approximately 25% of the WT albumin doses reached the blood circulation 24 h after intranasal delivery in Tg32 alb KO mice. This may correspond to 60 to 70% recovery in total if we consider that one-third of WT albumin is usually present in the blood and two-thirds is in the extravascular compartment. Accordingly, intranasal delivery to albumin-preloaded mice of scFv-WT and scFv-QMP showed that the resulting blood concentration of scFv-QMP was more than fourfold higher than the blood concentration of scFv-WT in Tg32 alb KO mice 24 h after administration. Maximum concentrations of scFv-QMP in sera were obtained at 8 h. The time to reach the maximum concentration of biologics may differ depending on biological properties themselves and the model used for pharmacokinetic assessment.

Bequignon et al. used an *in vitro* model of HNEC primary culture to study infliximab transcytosis. Infliximab is an IgG1 therapeutic mAb mostly used for the treatment of autoimmune disorders. The apical-to-basal experiment demonstrated effective and dose-dependent infliximab transfer across the HNECs on both day 7 and day 21 of cell differentiation.

Samson et al. demonstrated the transmucosal transport and bioavailability of bevacizumab [46]. Bevacizumab is an IgG1 therapeutic mAb directed against the vascular endothelial growth factor, and is mostly used for the treatment of some cancers. After intranasal delivery of bevacizumab in porcine olfactory mucosa, the total recovery of bevacizumab throughout the 2.5 h experiment was 83%. Histopathological analyses revealed that bevacizumab was distributed at the mucosal surface (53%), intracellularly (19%) and throughout the nasal mucosa (11%).

Finally, Ladel et al. in 2018 demonstrated the potential FcRn-mediated transport of epithelial and basal cells towards the lamina propria, facilitating the apical uptake of allogenic and, in lesser amounts, xenogenic IgG [15]. A year later, they also demonstrated that only traces of porcine IgGs (pIgGs) could be recovered at the basolateral compartment in *ex vivo* olfactory tissue, while human IgGs (hIgGs) reached far higher levels [16]. They also demonstrated comparable permeation rates for human and porcine IgG in primary cells from porcine olfactory epithelium (OEPC), which displayed the highest expression of FcRn. Nevertheless, at early time points in OEPC ALI cultures, the permeation of the hIgGs was significantly faster than that of the pIgGs [16].

### 3.4. Factors Influencing Transcytosis

It seems easily understandable that FcRn-mediated biologics-transcytosis may be influenced by environmental factors. Röhm et al. used a nebulization platform to evaluate

different formulations of therapeutics containing biologics, and five different excipients (i.e., arginine, cyclodextrin, polysorbate, sorbitol, and trehalose) with three concentration levels were tested for each. Three different formulations (F1, F2, and F3) containing different concentrations of trehalose, sorbitol, arginine, polysorbate and cyclodextrin were tested to minimize aerosolization-induced protein aggregation and maximize permeation through an *in vitro* epithelial cell barrier [35]. After a 90 min or 240 min incubation time, protein concentrations were determined in the abluminal media by either ELISA or fluorescence spectroscopy. F1 reduced the aggregation of native Fab and IgG relative to vehicle by up to 50% and enhanced the transepithelial permeation rate up to 2.8-fold in comparison to the vehicle. F2 also improved the transport rate, but F3 did not [35].

In 2019, Ladel et al. evaluated the influence of IgG glycosylation on transcytosis by comparing the permeation rate of deglycosylated (DG) hIgGs to that of wild-type (WT) hIgGs. They demonstrated that the permeation rate was significantly higher for DG hIgG than for WT hIgG in both OEPC and RPMI cells. Interestingly, the permeation rate and flux through OEPC cells were significantly higher than the permeation rate through RPMI cells for both DG hIgGs and hIgGs, thus suggesting that transcytosis efficiency also depends on cell type. Finally, species-dependent binding to IgG receptors or species-dependent IgG trafficking and/or degradation pathways influenced the permeation of IgGs through the olfactory mucosa, and it was shown that hIgGs reached higher levels than pIgGs. The authors concluded that the permeation behaviour of DG and WT hIgG displayed similar patterns in *in vitro* and *ex vivo* models [16].

### 3.5. Toxicity of Intranasal Delivery

Only three out of the 12 studies included evaluated the potential toxicity of biologics' intranasal delivery. Globally, all of these studies found that the intranasal delivery of biologics was generally safe and did not induce specific side effects. Bequignon et al. assessed the toxicity of infliximab intranasal delivery using two methods. Transepithelial electrical resistance measurements were used to assess monolayer permeability, and trypan blue exclusion was used to assess cellular viability. It is important to note that no cellular toxicity was observed using either method after a 4 h incubation period at 37 °C with infliximab [9]. In addition, Samson et al. performed histological analyses after intranasal delivery of bevacizumab. There was no evidence of histological effects, confirming that nasal delivery of bevacizumab was harmless [46].

### 3.6. Selected Studies Drawbacks

Drawing strong conclusions about intranasal delivery of biologics may be premature owing to the small number of studies included and the heterogeneity in the models used, as well as biologics tested and the reported results.

The doses of biologics tested varied a lot among the studies, even for similar study designs: (i) for *in vivo* studies from 1 µg [69] to 2.5 mg [61], considering 10 to 20 g per mouse; (ii) for *in vitro* studies from 12.5 ng [9] to 4 mg [35]; and (iii) for *ex vivo* studies from 8 µg [15] to 500 µg [46]. None of the studies tried to identify a saturation kinetic.

The time for collecting data varied widely across studies. *In vivo* assessment of the efficiency and/or toxicity of biologics generally used a 1 month follow-up in the majority of the studies, but some had a follow-up of over 6 months after intranasal delivery [29]. The time of incubation used in the *in vitro* and *ex vivo* studies ranged from 30 min [61] to 6 days [15,16,26,46]. During these periods, samplings were performed regularly.

The nasal epithelial cells used for transcytosis assays of biologics were either primary cultures of HNECs [9,10], human-derived RPMI cells [16,35] or porcine-derived OEPCs [16]. *In vivo* studies were performed on mice in five studies [26–29,69] and on rats in one study [61]. Both *ex vivo* studies were performed on porcine olfactory mucosae [15,16]. Regarding animal studies, both BALB/c [26,27] and C57BL/6 [27–29,69] backgrounds were used as WT; these were mostly 6- to 8-week-old females [28,29] but also 8- to 12-week-old females [69]. FcRn knockout (KO) mice on a C57BL/6 background [28,29] and on a

BALB/c background [26] were also used. Bern et al. also specifically studied a human FcRn transgenic mouse model that lacked expression of both mouse FcRn and mouse albumin [B6.Cg-Albem12 Mvw Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT)32Dcr/Mvw]; homozygous Tg32 alb knockout (KO) mice] [26]. Finally, Kumar et al. purchased adult female Sprague Dawley rats (180–200 g; Envigo) for all in vivo experiments. Some studies used both in vitro and in vivo models to study transcytosis and interactions with FcRn, but the cells used in vitro were not airway epithelial nasal cells; thus, their results are not described in this review [26,28,29].

#### 4. Discussion

This systematic review focused on the role of FcRn in the nasal administration of biologics. For almost twenty years, researchers have demonstrated the involvement of FcRn in IgG transport in various tissues and cell types [7,11,32,70,71]. Accordingly, all of the studies included in this review demonstrated efficient transcytosis [9,15,16,26–29,35,46,61,69] of all of the biologics tested, irrespective of their molecular weight or the dose administered; therefore, they indicate that nasal administration may represent an efficient administration route for biologics for inducing both local and systemic effects. However, several limitations in the literature were identified. First, the doses used to obtain efficient transport through the nasal or olfactory epithelium differed dramatically among the studies, and no meta-analysis could be conducted. Second, regarding the well-known pharmacokinetic characteristics, pH plays a huge role; yet, it was not specified in most of the included studies [10,15,27–29,35,46,61,69]. Third, the type of sample used was heterogeneous, mostly because of the design of the studies. All but one in vivo study used mice as a model [26–29,69], all but one ex vivo study used porcine olfactory mucosa [15,16,46] and the in vitro studies were either on HNECs [9], RPMI cells [16,35] or OEPC [16]. The nasal route is a promising non-invasive method of delivery for mAbs to treat respiratory diseases, as it has demonstrated therapeutic responses in various models and leads to high mAb concentrations in the lungs, while limiting mAb passage into systemic circulation [56,72–74].

##### 4.1. FcRn Expression

Among the 12 studies included in this systematic review, six first confirmed the expression of FcRn in their different models that were chosen to assess biologic-transcytosis across airway epithelial cells [9,10,15,16,28,29]. However, they did not all demonstrate where FcRn was expressed, and the exact mechanism underlying transcytosis is unclear. Some authors have demonstrated that FcRn is preferentially expressed at the basolateral side of cells in humans [10]. Others used immunofluorescence staining against FcRn in OEPC, and showed that FcRn is not expressed in all epithelial cells but varies heavily in the cellular monolayer, indicating that FcRn expression is highly dependent on the cell type [75]. This finding supports the common assumption that uptake is based mainly on pinocytosis, reinforcing the idea that nasal epithelial IgG trafficking is only FcRn-dependent. Such an assumption would suppose that FcRn-dependent IgG transport is species-independent [76]. In contrast, other authors excluded the notion that nasal epithelial IgG trafficking is only FcRn-dependent because of the insensitivity of FcRn to Fc-deglycosylation [16,77,78]. Access to the CNS after intranasal administration of biologics is also believed to involve both FcRn-dependent mechanisms and an FcRn-independent mechanism. The intranasal delivery of macromolecules may allow them to be absorbed into the systemic circulation via nasal blood vessels and access the CNS by crossing the blood–brain barrier/blood–cerebrospinal fluid barriers, or they may access the CNS via direct perineural, perivascular and lymphatic pathways that exist in the nasal mucosa [44,75,77,79,80].

#### 4.2. Transcytosis Models

In general, the amount of deposited drug and the percentage of transported drug are not comparable from one study to another, as they differ dramatically when altering experimental conditions. Moreover, different types of samples were used to test the nasal route, which made it difficult to compare transcytosis efficiency from one study to another. Despite this heterogeneity, the nasal epithelial cell line RPMI used by Röhms [35] and Ladel [16] is well characterized in the literature and was used in several studies as a model for the respiratory epithelium of the nasal cavity and the bronchus [81,82]. Indeed, this cell line, derived from cancerous human nasal squamous epithelium, is currently used as a standard model of intranasal drug delivery, since specimens of human nasal mucosa are generally unavailable [83,84]. In addition, the primary culture of HNECs used by Bequignon et al. [9] has previously been well-demonstrated in several experiments [85,86]. The *in vitro* model reported in this review is well characterized. Nevertheless, another limitation regarding the lack of correlation between FcRn binding characteristics *in vitro* and *in vivo* could be raised. Indeed, several factors may contribute to this lack of a correlation: (i) for biologics that bind negligibly to FcRn at near neutral pH, uptake of mAbs into cells is dependent on fluid phase pinocytosis [87]; (ii) for some biologics, the endosomal environment (salt concentration, temperature, etc.) may result in different binding properties than those observed when carrying out interaction analyses *in vitro*, typically at 25 °C; and (iii) degradation or modification of biologics during storage can lead to a loss of binding affinity for FcRn [44]. Given the variability in binding constants from one laboratory to another, it may also be instructive to develop a standardized protocol for FcRn–IgG interaction studies, as discussed in other studies [88–90].

Another possibility is to use *ex vivo* models. Porcine mucosa has been used to model the human nasal mucosa. This is interesting because the mucosa of both porcine and humans are highly similar, and the cross-species transport of human IgG by porcine FcRn has already been shown by Stirling et al. [15,76,83,84,91]. In the *ex vivo* model, more complex factors interfere with IgG permeation, such as the interaction with the local immune system and uptake in neuronal fibres, which make it more similar to *in vivo* conditions [16].

Finally, *in vivo* models can be used, such as mouse models. Variations in residue encompassing the FcRn–IgG interaction site across species lead to differences in binding behaviour that have direct relevance to the use of mice as preclinical models [41,92,93]. Unfortunately, mice also possess a higher affinity for FcRn, as well as a greater capacity to form clearance-enhancing anti-drug antibodies. In addition, mice have lower levels of endogenous IgGs, which results in a lower level of FcRn binding competition than in humans [94]. Collectively, these characteristics undermine the relevance of WT mice as models for human Ab pharmacokinetics [95,96]. Moreover, species-related differences must be considered. For example, unlike in humans, porcine maternal IgGs do not cross the porcine placenta to reach the foetus, even though FcRn is expressed there [97]. Unlike FcRn in mice, monkey FcRn binds to human albumin with similar binding kinetics as albumin from the same species [98]. Thus, nonhuman primates are likely to be a good model to assess the effect of biotinylated albumin on the delivery and plasma half-life of human albumin fusions before testing in humans [99]. Nonhuman primates, especially cynomolgus monkeys, are also the models of choice to probe FcRn dynamics due to their relatively robust ability to recapitulate human-like pharmacokinetic properties [95,100]. However, high-throughput screens in cynomolgus monkeys are impractical due to financial and ethical constraints. Mice, on the other hand, can easily be used with significantly higher throughput. Several transgenic mouse models have been developed in the absence of high-throughput preclinical models with human-like FcRn dynamics that express human FcRn to varying degrees [101–105].

#### 4.3. Factors Influencing Nasal Transcytosis

It is well known that the FcRn/IgG interaction is highly dependent on pH. FcRn binds IgG with nanomolar affinities at a pH of 6.5–6.0, which is found in intracellular vesicles, and shows negligible interactions at a pH of 7.4–7.0 [92], which allows for IgG release in the bloodstream [93]. The pH of the mucous layer in the nose is reported to be approximately 6, which is another argument favouring the use of the nasal route [38]. However, the influence of apical pH on transcytosis efficiency was not assessed in nine out of the 12 studies included in this review [10,15,27–29,35,46,61,69]. The pH used for the experiments was only reported in one [16] of the four ex vivo studies included [10,15,16,46], but the authors did not discuss the impact it may have had on the results. In contrast, Bequignon et al. clearly demonstrated that an acidic pH (pH = 6) was necessary for efficient transcytosis [9]. Finally, only one out of the six in vivo studies [26–29,61,69] included reported a pH for intranasal administration of scFv-Alb (pH = 5.5) [26]. IgG transcytosis through the nasal mucosa seemed relatively rapid, with mAbs detected 4 h after incubation with airway-derived cells [9]. In addition, IgG transcytosis has been shown to be dose-dependent [9,26].

Subsequent work demonstrated that intranasally applied low molecular weight peptides, e.g., oxytocin (1 kDa), readily access the CSF of rodents [71,92], monkeys [93] and humans [81]. In addition, the nasal route for biologics administration is not always successful. The most important limiting factors for the nasal absorption of high molecular weight molecules such as mAbs are low epithelial membrane permeability and mucociliary clearance [106]. Both factors are included in the cellular OEPC model used by Ladel et al. [16].

The degradation or modification of biologics during aerosolization can lead to a loss of binding affinity for FcRn. Proteins are sensitive to aerosolization-associated shear stress, and may lose biological activity if used in aerosols [107,108]. Storage conditions may also impact the binding affinity of biologics for FcRn. It has been shown that oxidation of one methionine residue, Met252, in proximity to the human FcRn–IgG1 interaction site can lead to a decreased in vivo half-life [79,80,109,110].

Another factor that may result in different binding properties is temperature [44], but little data were available in the included studies.

#### 4.4. Biologics Integrity

Questions regarding the integrity of transcytosed biologics are rising, as evidence of the efficiency of nasal administration gradually accumulates. SDS-PAGE and autoradiographic analysis of the brain soluble protein fraction yielded distinct heavy and light chain [<sup>125</sup>I]-labelled protein bands following intranasal administration of radiolabelled [<sup>125</sup>I]-IgG in the study of Kumar et al. in 2018 [61]. Such detection of heavy and light chain bands has generally been considered consistent with intact IgG being present in vivo, e.g., in studies analysing the endogenous and exogenous IgG content in the brain [111]. The efficacy of immunization in a mouse model challenged with Ft, HSV-2 or HIV is also proof of biological integrity [27–29,69]. Indeed, the mice survived an intravaginal challenge weeks after intranasal administration of ICs. Intranasal administration is efficient, and biologics maintain their integrity after reaching systemic circulation. After acknowledging this, it is still unclear as to how much went through and the exact pathway used. Kumar et al. demonstrated significantly higher [<sup>125</sup>I]-IgG concentrations within the CNS after intranasal administration compared to intra-arterial doses that produced similar end-point blood [<sup>125</sup>I]-IgG levels. Nevertheless, these concentrations were still low and indicate that only a small fraction of intranasally administered [<sup>125</sup>I]-IgG accessed the CNS at an early time point (30 min) following a single acute dose [61]. Repeated intranasal dosing with smaller doses may be considered to achieve similar or higher concentrations [61].

Another possibility to enhance transepithelial transport is the administration of tight junction modulators. This has been shown to improve macromolecule transport across numerous epithelial barriers throughout the body, including at nasal sites [112]. Indeed, permeation enhancement at the nasal epithelium is expected to yield higher drug and tracer levels in the lamina propria, where nerve-associated pathways to the brain may

be most accessible [60]. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), a type IV collagenase and member of a large class of zinc-dependent endopeptidases, has been shown to be involved in extracellular matrix (ECM) remodelling [113], as well as tight junction modulation, in part through alteration of claudin-1 [114]. MMP-9 is naturally expressed in its active form in the olfactory mucosa, where it likely plays a role in the continual replacement of epithelial cells (re-epithelialization) and olfactory sensory neurons during regular cell turnover [115]. Recently, it has been shown that intranasal MMP-9 can be used as a local nasal permeability enhancer [116]. It is important to keep in mind that nasal permeability enhancers cause significant nasal irritation and mucosal toxicity [117], and additional studies are needed.

Although most therapeutic mAbs are delivered intravenously, several are delivered via other routes. The subcutaneous route offers the major advantage that mAbs can be self-administered, prompting interest in understanding the processes through which subcutaneously delivered therapeutics, including mAbs, enter circulation [45]. Knowledge of these processes may inform antibody engineering strategies to increase the effective therapeutic dose.

## 5. Conclusions and Future Perspectives

This systematic review confirmed the expression of FcRn in nasal airway and olfactory epithelium, as well as its potential role in IgG transcytosis across airway-polarized cell layers. It is now clear that FcRn enables the bi-directional transfer of IgG molecules, i.e., to deliver IgG into the lumen from the tissue space, as well as the return of IgG-bound luminal antigens back into the lamina propria. Choosing intranasal delivery over oral delivery for biologics may be a great non-invasive method to induce systemic effects, as it would avoid biologics' degradation by the extremely low pH and the presence of digestive enzymes in the gastrointestinal tract [66]. In addition, intranasal delivery may represent a comfortable and non- to minimally invasive way of self-administration [36].

Major progress has been made with regard to FcRn-mediated mucosa-transcytosis. However, further developments are required for better understanding the pharmacokinetic and pharmacodynamics properties of FcRn-mediated IgG-transcytosis through mucosal tissue. Specific studies evaluating the dose–response effect, the timing of FcRn-mediated IgG-transcytosis and the uptake processes in an inflammatory environment should be initiated. Further, variations in these characteristics across cell types, such as olfactory cells vs. ciliated cells, are unexplored. Whether IgG-transcytosis is exclusively dependent on FcRn should also be further studied using an FcRn antagonist. Altogether, the characterization of intranasal delivery of biologics and the role of FcRn in this setting are expected to increase in the near future. This would be helpful for the clinical development of the intranasal delivery of various biologics, including mAbs or modified Fc-fusion proteins, for the treatment of a wide range of diseases.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22126475/s1>, Supplementary File S1: Detailed Search Strategy and Equations Used, Supplementary File S2: Detailed Risk of Bias Using OHAT, Supplementary File S3: Type of Samples and Protocols of the Included In Vivo Studies, Supplementary File S4: Type of Samples and Protocols of the Included In Vitro and Ex Vivo Studies.

**Author Contributions:** M.F., M.N. and E.B. performed the literature review. M.F., M.N., S.L.Q. and S.B. drafted the manuscript, and prepared the figures; M.F., S.L.Q., S.B., C.G., A.C., B.L. and E.B. edited the manuscript and provided conceptual guidance. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not Applicable.

**Informed Consent Statement:** Not Applicable.

**Data Availability Statement:** Not Applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Simister, N.E.; Mostov, K.E. An Fc Receptor Structurally Related to MHC Class I Antigens. *Nature* **1989**, *337*, 184–187. [[CrossRef](#)]
2. Rodewald, R.; Abrahamson, D.R. Receptor-Mediated Transport of IgG across the Intestinal Epithelium of the Neonatal Rat. *Ciba Found. Symp.* **1982**, 209–232. [[CrossRef](#)]
3. Rodewald, R.; Kraehenbuhl, J.P. Receptor-Mediated Transport of IgG. *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 159s–164s. [[CrossRef](#)]
4. Simister, N.E.; Rees, A.R. Isolation and Characterization of an Fc Receptor from Neonatal Rat Small Intestine. *Eur. J. Immunol.* **1985**, *15*, 733–738. [[CrossRef](#)]
5. Wallace, K.H.; Rees, A.R. Studies on the Immunoglobulin-G Fc-Fragment Receptor from Neonatal Rat Small Intestine. *Biochem. J.* **1980**, *188*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rath, T.; Kuo, T.T.; Baker, K.; Qiao, S.-W.; Kobayashi, K.; Yoshida, M.; Roopenian, D.; Fiebiger, E.; Lencer, W.I.; Blumberg, R.S. The Immunologic Functions of the Neonatal Fc Receptor for IgG. *J. Clin. Immunol.* **2013**, *33* (Suppl. 1), 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Roopenian, D.C.; Akilesh, S. FcRn: The Neonatal Fc Receptor Comes of Age. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 715–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ward, E.S.; Ober, R.J. Chapter 4: Multitasking by Exploitation of Intracellular Transport Functions the Many Faces of FcRn. *Adv. Immunol.* **2009**, *103*, 77–115. [[CrossRef](#)]
9. Bequignon, E.; Dhommée, C.; Angely, C.; Thomas, L.; Bottier, M.; Escudier, E.; Isabey, D.; Coste, A.; Louis, B.; Papon, J.-F.; et al. FcRn-Dependent Transcytosis of Monoclonal Antibody in Human Nasal Epithelial Cells In Vitro: A Prerequisite for a New Delivery Route for Therapy? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1379. [[CrossRef](#)]
10. Heidl, S.; Ellinger, I.; Niederberger, V.; Walth, E.E.; Fuchs, R. Localization of the Human Neonatal Fc Receptor (FcRn) in Human Nasal Epithelium. *Protoplasma* **2016**, *253*, 1557–1564. [[CrossRef](#)]
11. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bitonti, A.J.; Dumont, J.A. Pulmonary Administration of Therapeutic Proteins Using an Immunoglobulin Transport Pathway. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1106–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. 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. [[CrossRef](#)]
15. Ladel, S.; Flamm, J.; Zadeh, A.S.; Filzwieser, D.; Walter, J.-C.; Schlossbauer, P.; Kinscherf, R.; Lischka, K.; Luksch, H.; Schindowski, K. Allogenic Fc Domain-Facilitated Uptake of IgG in Nasal Lamina Propria: Friend or Foe for Intranasal CNS Delivery? *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 107. [[CrossRef](#)]
16. Ladel, S.; Schlossbauer, P.; Flamm, J.; Luksch, H.; Mizaikoff, B.; Schindowski, K. Improved In Vitro Model for Intranasal Mucosal Drug Delivery: Primary Olfactory and Respiratory Epithelial Cells Compared with the Permanent Nasal Cell Line RPMI 2650. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 367. [[CrossRef](#)]
17. Ghetie, V.; Ward, E.S. FcRn: The MHC Class I-Related Receptor That Is More than an IgG Transporter. *Immunol. Today* **1997**, *18*, 592–598. [[CrossRef](#)]
18. 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. [[CrossRef](#)]
19. 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. [[CrossRef](#)]
20. Lobo, E.D.; Hansen, R.J.; Balthasar, J.P. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 2645–2668. [[CrossRef](#)]
21. Nissim, A.; Chernajovsky, Y. Historical Development of Monoclonal Antibody Therapeutics. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, 3–18. [[CrossRef](#)]
22. 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-1 Receptor. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 1746–1759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Firan, M.; Bawdon, R.; Radu, C.; Ober, R.J.; Eaken, D.; Antohe, F.; Ghetie, V.; Ward, E.S. The MHC Class I-Related Receptor, FcRn, Plays an Essential Role in the Maternofetal Transfer of Gamma-Globulin in Humans. *Int. Immunol.* **2001**, *13*, 993–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. McCarthy, K.M.; Yoong, Y.; Simister, N.E. Bidirectional Transcytosis of IgG by the Rat Neonatal Fc Receptor Expressed in a Rat Kidney Cell Line: A System to Study Protein Transport across Epithelia. *J. Cell Sci.* **2000**, *113 Pt 7*, 1277–1285. [[CrossRef](#)]

26. Bern, M.; Nilsen, J.; Ferrarese, M.; Sand, K.M.K.; Gjølborg, T.T.; Lode, H.E.; Davidson, R.J.; Camire, R.M.; Bækkevold, E.S.; Foss, S.; et al. An Engineered Human Albumin Enhances Half-Life and Transmucosal Delivery When Fused to Protein-Based Biologics. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rawool, D.B.; Bitsaktis, C.; Li, Y.; Gosselin, D.R.; Lin, Y.; Kurkure, N.V.; Metzger, D.W.; Gosselin, E.J. Utilization of Fc Receptors as a Mucosal Vaccine Strategy against an Intracellular Bacterium, *Francisella Tularensis*. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 5548–5557. [[CrossRef](#)]
28. Lu, L.; Palaniyandi, S.; Zeng, R.; Bai, Y.; Liu, X.; Wang, Y.; Pauza, C.D.; Roopenian, D.C.; Zhu, X. A Neonatal Fc Receptor-Targeted Mucosal Vaccine Strategy Effectively Induces HIV-1 Antigen-Specific Immunity to Genital Infection. *J. Virol.* **2011**, *85*, 10542–10553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ye, L.; Zeng, R.; Bai, Y.; Roopenian, D.C.; Zhu, X. Efficient Mucosal Vaccination Mediated by the Neonatal Fc Receptor. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 158–163. [[CrossRef](#)]
30. Ko, S.-Y.; Pegu, A.; Rudicell, R.S.; Yang, Z.; Joyce, M.G.; Chen, X.; Wang, K.; Bao, S.; Kraemer, T.D.; Rath, T.; et al. Enhanced Neonatal Fc Receptor Function Improves Protection against Primate SHIV Infection. *Nature* **2014**, *514*, 642–645. [[CrossRef](#)]
31. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yoshida, M.; Kobayashi, K.; Kuo, T.T.; Bry, L.; Glickman, J.N.; Claypool, S.M.; Kaser, A.; Nagaishi, T.; Higgins, D.E.; Mizoguchi, E.; et al. Neonatal Fc Receptor for IgG Regulates Mucosal Immune Responses to Luminal Bacteria. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 2142–2151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yoshida, M.; Masuda, A.; Kuo, T.T.; Kobayashi, K.; Claypool, S.M.; Takagawa, T.; Kutsumi, H.; Azuma, T.; Lencer, W.I.; Blumberg, R.S. IgG Transport across Mucosal Barriers by Neonatal Fc Receptor for IgG and Mucosal Immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* **2006**, *28*, 397–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ladinsky, M.S.; Huey-Tubman, K.E.; Bjorkman, P.J. Electron Tomography of Late Stages of FcRn-Mediated Antibody Transcytosis in Neonatal Rat Small Intestine. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 2537–2545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Röhm, M.; Carle, S.; Maigler, F.; Flamm, J.; Kramer, V.; Mavoungou, C.; Schmid, O.; Schindowski, K. A Comprehensive Screening Platform for Aerosolizable Protein Formulations for Intranasal and Pulmonary Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 537–546. [[CrossRef](#)]
36. Pridgen, E.M.; Alexis, F.; Kuo, T.T.; Levy-Nissenbaum, E.; Karnik, R.; Blumberg, R.S.; Langer, R.; Farokhzad, O.C. Transepithelial Transport of Fc-Targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 213ra167. [[CrossRef](#)]
37. Martins, J.P.; Kennedy, P.J.; Santos, H.A.; Barrias, C.; Sarmiento, B. A Comprehensive Review of the Neonatal Fc Receptor and Its Application in Drug Delivery. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *161*, 22–39. [[CrossRef](#)]
38. 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. [[CrossRef](#)]
39. Chaudhury, C.; Mehnaz, S.; Robinson, J.M.; Hayton, W.L.; Pearl, D.K.; Roopenian, D.C.; Anderson, C.L. The Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 315–322. [[CrossRef](#)]
40. Andersen, J.T.; Dee Qian, J.; Sandlie, I. The Conserved Histidine 166 Residue of the Human Neonatal Fc Receptor Heavy Chain Is Critical for the PH-Dependent Binding to Albumin. *Eur. J. Immunol.* **2006**, *36*, 3044–3051. [[CrossRef](#)]
41. 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. [[CrossRef](#)]
42. Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495–497. [[CrossRef](#)]
43. Brekke, O.H.; Sandlie, I. Therapeutic Antibodies for Human Diseases at the Dawn of the Twenty-First Century. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 52–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ward, E.S.; Devanaboyina, S.C.; Ober, R.J. Targeting FcRn for the Modulation of Antibody Dynamics. *Mol. Immunol.* **2015**, *67*, 131–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wang, W.; Wang, E.Q.; Balthasar, J.P. Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *84*, 548–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Samson, G.; García 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Low, S.C.; Nunes, S.L.; Bitonti, A.J.; Dumont, J.A. Oral and Pulmonary Delivery of FSH-Fc Fusion Proteins via Neonatal Fc Receptor-Mediated Transcytosis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2005**, *20*, 1805–1813. [[CrossRef](#)]
48. Benedict, C.; Hallschmid, M.; Schmitz, K.; Schultes, B.; Ratter, F.; Fehm, H.L.; Born, J.; Kern, W. Intranasal Insulin Improves Memory in Humans: Superiority of Insulin Aspart. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 239–243. [[CrossRef](#)]
49. Benedict, C.; Hallschmid, M.; Hatke, A.; Schultes, B.; Fehm, H.L.; Born, J.; Kern, W. Intranasal Insulin Improves Memory in Humans. *Psychoneuroendocrinology* **2004**, *29*, 1326–1334. [[CrossRef](#)]
50. Benedict, C.; Frey, W.H.; Schiöth, H.B.; Schultes, B.; Born, J.; Hallschmid, M. Intranasal Insulin as a Therapeutic Option in the Treatment of Cognitive Impairments. *Exp. Gerontol.* **2011**, *46*, 112–115. [[CrossRef](#)]

51. Heni, M.; Wagner, R.; Kullmann, S.; Veit, R.; Mat Husin, H.; Linder, K.; Benkendorff, C.; Peter, A.; Stefan, N.; Häring, H.-U.; et al. Central Insulin Administration Improves Whole-Body Insulin Sensitivity via Hypothalamus and Parasympathetic Outputs in Men. *Diabetes* **2014**, *63*, 4083–4088. [[CrossRef](#)]
52. Kullmann, S.; Frank, S.; Heni, M.; Ketterer, C.; Veit, R.; Häring, H.-U.; Fritsche, A.; Preissl, H. Intranasal Insulin Modulates Intrinsic Reward and Prefrontal Circuitry of the Human Brain in Lean Women. *Neuroendocrinology* **2013**, *97*, 176–182. [[CrossRef](#)]
53. Balin, B.J.; Broadwell, R.D.; Salcman, M.; el-Kalliny, M. Avenues for Entry of Peripherally Administered Protein to the Central Nervous System in Mouse, Rat, and Squirrel Monkey. *J. Comp. Neurol.* **1986**, *251*, 260–280. [[CrossRef](#)]
54. Warnken, Z.N.; Smyth, H.D.C.; Watts, A.B.; Weitman, S.; Kuhn, J.G.; Williams, R.O. Formulation and Device Design to Increase Nose to Brain Drug Delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *35*, 213–222. [[CrossRef](#)]
55. Stote, R.; Miller, M.; Marbury, T.; Shi, L.; Strange, P. Enhanced Absorption of Nasulin<sup>TM</sup>, an Ultrarapid-Acting Intranasal Insulin Formulation, Using Single Nostril Administration in Normal Subjects. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2011**, *5*, 113–119. [[CrossRef](#)]
56. Guilleminault, L.; Azzopardi, N.; Arnoult, C.; Sobilo, J.; Hervé, 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Engelhardt, L.; Röhm, M.; Mavoungou, C.; Schindowski, K.; Schafmeister, A.; Simon, U. First Steps to Develop and Validate a CFPD Model in Order to Support the Design of Nose-to-Brain Delivered Biopharmaceuticals. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 1337–1350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Möller, W.; Schuschnig, U.; Bartenstein, P.; Meyer, G.; Häussinger, K.; Schmid, O.; Becker, S. Drug Delivery to Paranasal Sinuses Using Pulsating Aerosols. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2014**, *27*, 255–263. [[CrossRef](#)]
59. Coates, A.L. Guiding Aerosol Deposition in the Lung. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 304–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lochhead, J.J.; Thorne, R.G. Intranasal Delivery of Biologics to the Central Nervous System. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 614–628. [[CrossRef](#)]
61. Kumar, N.N.; Lochhead, J.J.; Pizzo, M.E.; Nehra, G.; Boroumand, S.; Greene, G.; Thorne, R.G. Delivery of Immunoglobulin G Antibodies to the Rat Nervous System Following Intranasal Administration: Distribution, Dose-Response, and Mechanisms of Delivery. *J. Control Release* **2018**, *286*, 467–484. [[CrossRef](#)]
62. Siddaway, A.P.; Wood, A.M.; Hedges, L.V. How to Do a Systematic Review: A Best Practice Guide for Conducting and Reporting Narrative Reviews, Meta-Analyses, and Meta-Syntheses. *Annu. Rev. Psychol.* **2019**, *70*, 747–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *BMJ* **2021**, *372*, n71. [[CrossRef](#)]
64. Moher, D.; Shamseer, L.; Clarke, M.; Ghersi, D.; Liberati, A.; Petticrew, M.; Shekelle, P.; Stewart, L.A. PRISMA-P Group Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) 2015 Statement. *Syst. Rev.* **2015**, *4*, 1. [[CrossRef](#)]
65. Higgins, J.P.T.; Altman, D.G.; Gøtzsche, P.C.; Jüni, P.; Moher, D.; Oxman, A.D.; Savovic, J.; Schulz, K.F.; Weeks, L.; Sterne, J.A.C.; et al. The Cochrane Collaboration’s Tool for Assessing Risk of Bias in Randomised Trials. *BMJ* **2011**, *343*, d5928. [[CrossRef](#)]
66. Viswanathan, M.; Berkman, N.D. Development of the RTI Item Bank on Risk of Bias and Precision of Observational Studies. *J. Clin. Epidemiol.* **2012**, *65*, 163–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sterne, J.A.C.; Savović, J.; Page, M.J.; Elbers, R.G.; Blencowe, N.S.; Boutron, I.; Cates, C.J.; Cheng, H.-Y.; Corbett, M.S.; Eldridge, S.M.; et al. RoB 2: A Revised Tool for Assessing Risk of Bias in Randomised Trials. *BMJ* **2019**, *366*, 14898. [[CrossRef](#)]
68. Ouzzani, M.; Hammady, H.; Fedorowicz, Z.; Elmagarmid, A. Rayyan—a Web and Mobile App for Systematic Reviews. *Syst. Rev.* **2016**, *5*, 210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Bitsaktsis, C.; Babadjanova, Z.; Gosselin, E.J. In Vivo Mechanisms Involved in Enhanced Protection Utilizing an Fc Receptor-Targeted Mucosal Vaccine Platform in a Bacterial Vaccine and Challenge Model. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 77–89. [[CrossRef](#)]
70. de Taeye, S.W.; Rispens, T.; Vidarsson, G. The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. *Antibodies Basel Switz.* **2019**, *8*, 30. [[CrossRef](#)]
71. Zhang, W.-D.; Wang, W.-H.; Li, S.-X.; Jia, S.; Zhang, X.-F.; Cao, T.-T. Localization of Neonatal Fc Receptor for IgG in Aggregated Lymphoid Nodules Area in Abomasum of Bactrian Camels (*Camelus Bactrianus*) of Different Ages. *BMC Vet. Res.* **2016**, *12*, 237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Hervé, V.; Rabbe, N.; Guilleminault, L.; Paul, F.; Schlick, L.; Azzopardi, N.; Duruisseaux, M.; Fouquenot, D.; Montharu, J.; Redini, F.; et al. VEGF Neutralizing Aerosol Therapy in Primary Pulmonary Adenocarcinoma with K-Ras Activating-Mutations. *mAbs* **2014**, *6*, 1638–1648. [[CrossRef](#)]
73. Respaud, R.; Marchand, D.; Pelat, T.; Tchou-Wong, K.-M.; Roy, C.J.; Parent, C.; Cabrera, M.; Guillemain, J.; Mac Loughlin, R.; Levacher, E.; et al. Development of a Drug Delivery System for Efficient Alveolar Delivery of a Neutralizing Monoclonal Antibody to Treat Pulmonary Intoxication to Ricin. *J. Control Release* **2016**, *234*, 21–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Respaud, R.; Vecellio, L.; Diot, P.; Heuzé-Vourc’h, N. Nebulization as a Delivery Method for MAbs in Respiratory Diseases. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2015**, *12*, 1027–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Cianga, C.; Cianga, P.; Plamadéala, P.; Amalinei, C. Nonclassical Major Histocompatibility Complex I-like Fc Neonatal Receptor (FcRn) Expression in Neonatal Human Tissues. *Hum. Immunol.* **2011**, *72*, 1176–1187. [[CrossRef](#)]
76. Stirling, C.M.A.; Charleston, B.; Takamatsu, H.; Claypool, S.; Lencer, W.; Blumberg, R.S.; Wileman, T.E. Characterization of the Porcine Neonatal Fc Receptor—Potential Use for Trans-Epithelial Protein Delivery. *Immunology* **2005**, *114*, 542–553. [[CrossRef](#)]

77. 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. [[CrossRef](#)]
78. Wada, R.; Matsui, M.; Kawasaki, N. Influence of N-Glycosylation on Effector Functions and Thermal Stability of Glycoengineered IgG1 Monoclonal Antibody with Homogeneous Glycoforms. *mAbs* **2019**, *11*, 350–372. [[CrossRef](#)]
79. Gao, X.; Ji, J.A.; Veeravalli, K.; Wang, Y.J.; Zhang, T.; McGreevy, W.; Zheng, K.; Kelley, R.F.; Laird, M.W.; Liu, J.; et al. Effect of Individual Fc Methionine Oxidation on FcRn Binding: Met252 Oxidation Impairs FcRn Binding More Profoundly than Met428 Oxidation. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 368–377. [[CrossRef](#)]
80. Stracke, J.; Emrich, T.; Rueger, P.; Schlothauer, T.; Kling, L.; Knaupp, A.; Hertenberger, H.; Wolfert, A.; Spick, C.; Lau, W.; et al. A Novel Approach to Investigate the Effect of Methionine Oxidation on Pharmacokinetic Properties of Therapeutic Antibodies. *mAbs* **2014**, *6*, 1229–1242. [[CrossRef](#)]
81. Bai, S.; Yang, T.; Abbruscato, T.J.; Ahsan, F. Evaluation of Human Nasal RPMI 2650 Cells Grown at an Air-Liquid Interface as a Model for Nasal Drug Transport Studies. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 1165–1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Kreft, M.E.; Jerman, U.D.; Lasič, E.; Lanišnik Rižner, T.; Hevir-Kene, N.; Peternel, L.; Kristan, K. The Characterization of the Human Nasal Epithelial Cell Line RPMI 2650 under Different Culture Conditions and Their Optimization for an Appropriate in Vitro Nasal Model. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 665–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Franz-Montan, M.; Serpe, L.; Martinelli, C.C.M.; da Silva, C.B.; Santos, C.P.D.; Novaes, P.D.; Volpato, M.C.; de Paula, E.; Lopez, R.F.V.; Groppo, F.C. Evaluation of Different Pig Oral Mucosa Sites as Permeability Barrier Models for Drug Permeation Studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *81*, 52–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Tulinski, P.; Fluit, A.C.; van Putten, J.P.M.; de Bruin, A.; Glorieux, S.; Wagenaar, J.A.; Duim, B. An Ex Vivo Porcine Nasal Mucosa Explants Model to Study MRSA Colonization. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53783. [[CrossRef](#)]
85. Coste, A.; Brugel, L.; Maître, B.; Boussat, S.; Papon, J.F.; Wingerstmann, L.; Peynègre, 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. [[CrossRef](#)]
86. Ramanathan, M.; 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. [[CrossRef](#)]
87. Igawa, T.; Ishii, S.; Tachibana, T.; Maeda, A.; Higuchi, Y.; Shimaoka, S.; Moriyama, C.; Watanabe, T.; Takubo, R.; Doi, Y.; et al. Antibody Recycling by Engineered PH-Dependent Antigen Binding Improves the Duration of Antigen Neutralization. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1203–1207. [[CrossRef](#)]
88. Datta-Mannan, A.; Wroblewski, V.J. Application of FcRn Binding Assays to Guide MAb Development. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2014**, *42*, 1867–1872. [[CrossRef](#)]
89. Neuber, T.; Frese, K.; Jaehrling, J.; Jäger, S.; Daubert, D.; Felderer, K.; Linnemann, M.; Höhne, A.; Kaden, S.; Kölln, J.; et al. Characterization and Screening of IgG Binding to the Neonatal Fc Receptor. *mAbs* **2014**, *6*, 928–942. [[CrossRef](#)]
90. Yeung, Y.A.; Leabman, M.K.; Marvin, J.S.; Qiu, J.; Adams, C.W.; Lien, S.; Starovasnik, M.A.; Lowman, H.B. Engineering Human IgG1 Affinity to Human Neonatal Fc Receptor: Impact of Affinity Improvement on Pharmacokinetics in Primates. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 7663–7671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Egli, J.; Schlothauer, T.; Spick, C.; Seeber, S.; Singer, T.; Odermatt, A.; Iglesias, A. The Binding of Human IgG to Minipig FcγRs—Implications for Preclinical Assessment of Therapeutic Antibodies. *Pharm. Res.* **2019**, *36*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Ober, R.J.; Radu, C.G.; Ghetie, V.; Ward, E.S. Differences in Promiscuity for Antibody-FcRn Interactions across Species: Implications for Therapeutic Antibodies. *Int. Immunol.* **2001**, *13*, 1551–1559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Martin, W.L.; West, A.P.; Gan, L.; Bjorkman, P.J. Crystal Structure at 2.8 Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of PH-Dependent Binding. *Mol. Cell* **2001**, *7*, 867–877. [[CrossRef](#)]
94. Gurbaxani, B.; Dostalek, M.; Gardner, I. Are Endosomal Trafficking Parameters Better Targets for Improving MAb Pharmacokinetics than FcRn Binding Affinity? *Mol. Immunol.* **2013**, *56*, 660–674. [[CrossRef](#)]
95. Valente, D.; Mauriac, C.; Schmidt, T.; Focken, I.; Beninga, J.; Mackness, B.; Qiu, H.; Vicat, P.; Kandira, A.; Radošević, K.; et al. Pharmacokinetics of Novel Fc-Engineered Monoclonal and Multispecific Antibodies in Cynomolgus Monkeys and Humanized FcRn Transgenic Mouse Models. *mAbs* **2020**, *12*, 1829337. [[CrossRef](#)]
96. Vaccaro, C.; Bawdon, R.; Wanjie, S.; Ober, R.J.; Ward, E.S. Divergent Activities of an Engineered Antibody in Murine and Human Systems Have Implications for Therapeutic Antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18709–18714. [[CrossRef](#)]
97. Jacobsen, B.; Hill, M.; Reynaud, L.; Hey, A.; Barrow, P. FcRn Expression on Placenta and Fetal Jejunum during Early, Mid-, and Late Gestation in Minipigs. *Toxicol. Pathol.* **2016**, *44*, 486–491. [[CrossRef](#)]
98. Andersen, J.T.; Dalhus, B.; Viuff, D.; Ravn, B.T.; Gunnarsen, K.S.; Plumridge, A.; Bunting, K.; Antunes, F.; Williamson, R.; Athwal, S.; et al. Extending Serum Half-Life of Albumin by Engineering Neonatal Fc Receptor (FcRn) Binding. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 13492–13502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Nilsen, J.; Bern, M.; Sand, K.M.K.; Grevys, A.; Dalhus, B.; Sandlie, I.; Andersen, J.T. Human and Mouse Albumin Bind Their Respective Neonatal Fc Receptors Differently. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Carter, P.J.; Lazar, G.A. Next Generation Antibody Drugs: Pursuit of the “High-Hanging Fruit”. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 197–223. [[CrossRef](#)]
101. Lee, C.-H.; Kang, T.H.; Godon, O.; Watanabe, M.; Delidakis, G.; Gillis, C.M.; Sterlin, D.; Hardy, D.; Cogné, M.; Macdonald, L.E.; et al. An Engineered Human Fc Domain That Behaves like a PH-Toggle Switch for Ultra-Long Circulation Persistence. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

102. Li, T.; Balthasar, J.P. FcRn Expression in Wildtype Mice, Transgenic Mice, and in Human Tissues. *Biomolecules* **2018**, *8*, 115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Proetzel, G.; Wiles, M.V.; Roopenian, D.C. Genetically Engineered Humanized Mouse Models for Preclinical Antibody Studies. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* **2014**, *28*, 171–180. [[CrossRef](#)]
104. Roopenian, D.C.; Christianson, G.J.; Proetzel, G.; Sproule, T.J. Human FcRn Transgenic Mice for Pharmacokinetic Evaluation of Therapeutic Antibodies. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2016**, *1438*, 103–114. [[CrossRef](#)]
105. Avery, L.B.; Wang, M.; Kavosi, M.S.; Joyce, A.; Kurz, J.C.; Fan, Y.-Y.; Dowty, M.E.; Zhang, M.; Zhang, Y.; Cheng, A.; et al. Utility of a Human FcRn Transgenic Mouse Model in Drug Discovery for Early Assessment and Prediction of Human Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *mAbs* **2016**, *8*, 1064–1078. [[CrossRef](#)]
106. Jadhav, K.; Gambhire, M.; Shaikh, I.; Kadam, V.; Pisal, S. Nasal Drug Delivery System-Factors Affecting and Applications. *Curr. Drug Ther.* **2007**, *2*, 27–38. [[CrossRef](#)]
107. Dellamary, L.; Smith, D.J.; Bloom, A.; Bot, S.; Guo, G.-R.; Deshmuk, H.; Costello, M.; Bot, A. Rational Design of Solid Aerosols for Immunoglobulin Delivery by Modulation of Aerodynamic and Release Characteristics. *J. Control Release* **2004**, *95*, 489–500. [[CrossRef](#)]
108. Schüle, S.; Schulz-Fademrecht, T.; Garidel, P.; Bechtold-Peters, K.; Frieb, W. Stabilization of IgG1 in Spray-Dried Powders for Inhalation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69*, 793–807. [[CrossRef](#)]
109. Bertolotti-Ciarlet, A.; Wang, W.; Lownes, R.; Pristatsky, P.; Fang, Y.; McKelvey, T.; Li, Y.; Li, Y.; Drummond, J.; Prueksaritanont, T.; et al. Impact of Methionine Oxidation on the Binding of Human IgG1 to Fc Rn and Fc Gamma Receptors. *Mol. Immunol.* **2009**, *46*, 1878–1882. [[CrossRef](#)]
110. Wang, W.; Vlasak, J.; Li, Y.; Pristatsky, P.; Fang, Y.; Pittman, T.; Roman, J.; Wang, Y.; Prueksaritanont, T.; Ionescu, R. Impact of Methionine Oxidation in Human IgG1 Fc on Serum Half-Life of Monoclonal Antibodies. *Mol. Immunol.* **2011**, *48*, 860–866. [[CrossRef](#)]
111. Bien-Ly, N.; Boswell, C.A.; Jeet, S.; Beach, T.G.; Hoyte, K.; Luk, W.; Shihadeh, V.; Ulufatu, S.; Foreman, O.; Lu, Y.; et al. Lack of Widespread BBB Disruption in Alzheimer’s Disease Models: Focus on Therapeutic Antibodies. *Neuron* **2015**, *88*, 289–297. [[CrossRef](#)]
112. Deli, M.A. Potential Use of Tight Junction Modulators to Reversibly Open Membranous Barriers and Improve Drug Delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 892–910. [[CrossRef](#)]
113. Yabluchanskiy, A.; Ma, Y.; Iyer, R.P.; Hall, M.E.; Lindsey, M.L. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiol. Bethesda Md* **2013**, *28*, 391–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Hackel, D.; Krug, S.M.; Sauer, R.-S.; Mousa, S.A.; Böcker, A.; Pflücke, D.; Wrede, E.-J.; Kistner, K.; Hoffmann, T.; Niedermirtl, B.; et al. Transient Opening of the Perineurial Barrier for Analgesic Drug Delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E2018–E2027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Gueye, Y.; Ferhat, L.; Sbai, O.; Bianco, J.; Ould-Yahoui, A.; Bernard, A.; Charrat, E.; Chauvin, J.-P.; Risso, J.-J.; Féron, F.; et al. Trafficking and Secretion of Matrix Metalloproteinase-2 in Olfactory Ensheathing Glial Cells: A Role in Cell Migration? *Glia* **2011**, *59*, 750–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Lochhead, J.J.; Wolak, D.J.; Pizzo, M.E.; Thorne, R.G. Rapid Transport within Cerebral Perivascular Spaces Underlies Widespread Tracer Distribution in the Brain after Intranasal Administration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2015**, *35*, 371–381. [[CrossRef](#)]
117. Marttin, E.; Verhoef, J.C.; Cullander, C.; Romeijn, S.G.; Nagelkerke, J.F.; Merkus, F.W. Confocal Laser Scanning Microscopic Visualization of the Transport of Dextran after Nasal Administration to Rats: Effects of Absorption Enhancers. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 631–637. [[CrossRef](#)]

## 7. Brief Report rFIX par voie IN

Cette étude a été soumise pour publication au *JTH* (IF=16, rang A) et a été acceptée en tant que communication orale pour le congrès européen de *l'ERS* à Sofia en juin 2023 et également au congrès national de la SFORL & CCF en octobre 2023.

### Résumé Français de l'article

L'hémophilie B (HB) est un trouble de la coagulation caractérisé par un déficit en facteur IX (FIX). Le traitement standard actuel de l'HB sévère est la prophylaxie par perfusions intraveineuses (IV) répétitives à long terme de FIX recombinant (rFIX) à demi-vie standard (SHL-rFIX) ou à demi-vie prolongée (EHL-rFIX). Des besoins subsistent en ce qui concerne le développement de voies d'administration non invasives pour les facteurs de coagulation. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité de l'administration IN de rFIX et de rFIX fusionné au fragment cristallisable des immunoglobulines (rFIX-Fc) chez la souris, ainsi que l'implication du récepteur néonatal au Fc (FcRn) dans ce passage transmuqueux. Des gouttes de rFIX et de rFIX-Fc ont été déposées dans les narines de souris de type sauvage (WT), FcRn knock-out (FcRn KO), FcRn humanisé (hFcRn) et FIX KO. L'absorption muqueuse de rFIX a été évaluée en mesurant les niveaux plasmatiques d'antigène FIX (FIX :Ag) et l'activité du FIX (FIX :C), à 15 minutes et en effectuant une analyse histologique de la muqueuse nasale immédiatement. Après administration IN, les résultats ont montré que le rFIX et le rFIX-Fc étaient délivrés de manière égale dans le compartiment sanguin, quelle que soit la souche de souris étudiée, par un mécanisme passif de transport à travers la barrière muqueuse, indépendant du FcRn. Nous avons effectué des analyses histologiques également et les résultats étaient similaires, sans différence significative entre les souches (WT, hFcRn, FcRn KO ou FIX KO) et les produits biologiques testés (rFIX vs rFIX-Fc), ce qui supporte l'hypothèse que l'absorption de rFIX et de rFIX-Fc par les muqueuses est essentiellement passive, par le biais d'un mécanisme paracellulaire, FcRn indépendant. Les niveaux plasmatiques de FIX :Ag et de FIX :C étaient augmentés après l'administration IN de rFIX et de rFIX-Fc chez les souris FIX KO. En moyenne, la biodisponibilité après administration IN était environ 5 à 6 fois inférieure à celle de l'administration IV, voie d'administration de référence encore aujourd'hui. Cette étude de preuve de concept décrit les données scientifiques supportant la voie IN FcRN indépendante comme une alternative à la perfusion IV pour l'administration du FIX dans le traitement de l'HB.

**In vivo intranasal delivery of coagulation factor IX: a proof-of-concept study**

Journal:	<i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Brief Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Fieux, Maxime; Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Service d'ORL, d'otoneurochirurgie et de chirurgie cervico-faciale, F-69310, Pierre Bénite, France; Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69003, Lyon, France; Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, F-94010 Créteil, France; CNRS EMR 7000, F-94010 Créteil, France</p> <p>Rovera, Renaud; UMR 5305, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1</p> <p>Coiffier, Céline; UMR 5305, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1</p> <p>Colomb, Evelyne; UMR 5305, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1</p> <p>Enjolras, Nathalie; EA 4609 Hémostase et cancer, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France</p> <p>Bequignon, Emilie; Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale, F-94010 Créteil, France; Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, F-94010 Créteil, France; CNRS EMR 7000, F-94010 Créteil, France</p> <p>Monge, Claire; UMR 5305, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1</p> <p>Le Quellec, Sandra; EA 4609 Hémostase et cancer, Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69003, Lyon, France; Unité d'hémostase clinique, Centre National de Référence de l'hémophilie, Hospices Civils de Lyon, France</p>
Key Words:	haemophilia B, administration, intranasal, fc receptor, neonatal, factor IX, mice

1 **Title:** *In vivo* intranasal delivery of coagulation factor IX: a proof-of-concept study

2  
3 **Authors:** Maxime Fieux, MD<sup>\*</sup>, †, ‡, §, ¶; Renaud Rovera<sup>\*\*</sup>; Céline Coiffier<sup>\*\*</sup>; Evelyne Colomb<sup>\*\*</sup>;  
4 Nathalie Enjolras<sup>††</sup>; Emilie Béquignon, MD, PhD<sup>‡,§,§§</sup>; Claire Monge, PhD<sup>§,\*\*,¶</sup> & Sandra Le  
5 Quellec, MD, PhD<sup>§,‡,††,¶¶</sup>

6 <sup>§</sup>co-senior authors

7  
8 <sup>\*</sup>*Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Service d'ORL, d'otoneurochirurgie et*  
9 *de chirurgie cervico-faciale, F-69310, Pierre Bénite, France*

10 <sup>†</sup> *Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69003, Lyon, France*

11 <sup>‡</sup> *Univ Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, F-94010 Créteil, France*

12 <sup>§</sup> *CNRS EMR 7000, F-94010 Créteil, France*

13 <sup>\*\*</sup>*UMR 5305, Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Institut de*  
14 *Biologie et Chimie des Protéines, CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1, 7 Passage du*  
15 *Vercors, CEDEX 07, 69367 Lyon, France.*

16 <sup>††</sup>*EA 4609 Hémostase et cancer, Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69003, Lyon, France.*

17 <sup>§§</sup>*Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de*  
18 *Chirurgie Cervico-Faciale, F-94010 Créteil, France*

19 <sup>¶¶</sup>*Unité d'hémostase clinique, Centre National de Référence de l'hémophilie, Hospices Civils de*  
20 *Lyon, France*

21  
22 **Corresponding author:**

23 Dr. Sandra Le Quellec

24 *Unité d'hémostase clinique, Centre National de Référence de l'hémophilie,*

25 *Hôpital Cardiologique Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon*

26 *59, boulevard Pinel, Bron, 69677, France*

27 Tél +33 4 72 11 88 10; Fax +33 4 72 11 88 17

28 E-mail: [sandra.le-quellec@chu-lyon.fr](mailto:sandra.le-quellec@chu-lyon.fr)

29 **Abstract**

30 **Background:** Haemophilia B (HB) is a bleeding disorder characterised by coagulation factor IX  
31 (FIX) deficiency. The current standard-of-care for severe HB is prophylaxis with long-term  
32 repetitive intravenous (IV) infusions of recombinant FIX (rFIX) with standard half-life (SHL-  
33 rFIX) or extended half-life (EHL-rFIX). Unmet needs remain regarding the development of non-  
34 invasive administration routes for coagulation factors. The aim of this study was to evaluate the  
35 effectiveness of intranasal delivery (IND) of rFIX and rFIX fused to Fc fragment (rFIX-Fc) in  
36 mice.

37 **Methods:** Drops of rFIX and rFIX-Fc were deposited in the nostrils of wild type (WT), FcRn  
38 knock-out (FcRn KO), FcRn humanised (hFcRn), and FIX KO mice. rFIX mucosal uptake was  
39 evaluated by measuring plasma FIX antigen (FIX:Ag) and FIX activity (FIX:C) levels, and by  
40 performing histological analysis of the nasal mucosa following IND.

41 **Results:** After IND, both rFIX and rFIX-Fc were equally delivered to the blood compartment,  
42 irrespective of the mouse strain studied, through a passive mechanism of transportation across the  
43 mucosal barrier, independent of FcRn receptor. Both FIX:Ag and FIX:C activity levels were  
44 increased following IND in FIX KO mice.

45 **Conclusion:** This proof-of-concept study describes evidence supporting the nasal route as an  
46 alternative to FIX IV infusion for the treatment of HB.

47

48 **Keywords:** haemophilia B; administration, intranasal; fc receptor, neonatal; factor IX; mice

49

50 **Essentials:** Lifelong prophylactic intravenous injections of coagulation factors is safe and  
51 effective in preventing bleeding in severe haemophilia but impacts patients' and caregivers'  
52 quality of life. There is still an unmet need regarding the development of non-invasive routes of  
53 administration for coagulation factors. This proof-of-concept study evaluated the feasibility of  
54 intranasal delivery (IND) of recombinant factor IX proteins (rFIX) for the treatment of  
55 haemophilia B in mice. Both rFIX and rFIX-Fc reached the blood compartment and increased  
56 FIX activity levels in mice following IND. Although further development and characterisation  
57 are needed, this study paves the way for an alternative administration route for coagulation factors  
58 that may improve patients' quality of life.

**59 1. Introduction**

60 Haemophilia B (HB) is a rare inherited X-linked recessive bleeding disorder characterised  
61 by coagulation factor IX (FIX) deficiency [1]. The bleeding phenotype of HB is correlated with  
62 FIX clotting activity (FIX:C) in plasma. Severe HB (FIX:C < 1IU/dL) is characterised by  
63 spontaneous and prolonged bleeding episodes, mostly in the joints, but which can be life-  
64 threatening such as when intracranial haemorrhage occurs [2]. The current standard-of-care for  
65 severe HB is prophylaxis, which consists of long-term regular (several times a month) intravenous  
66 (IV) infusions of recombinant FIX (rFIX) with standard half-life (SHL-rFIX) or extended half-  
67 life (EHL-rFIX) [3,4]. These rFIX can also be administered when bleedings occur (on-demand  
68 treatment) to stop them [3,5]. Although effective in preventing or treating bleeds, long-term  
69 regular IV infusions greatly impair patients' and caregivers' quality of life [4,6]. Recently, the  
70 first gene therapy product for the treatment of HB was approved in US by the Food and Drug  
71 administration and in Europe by the European Commission, showing stable FIX:C levels over 18  
72 months after a single IV infusion in adult patients with HB [7]. However, not all patients are  
73 eligible or may benefit from gene therapy. There is thus an unmet need regarding the development  
74 of non-invasive routes for the administration of coagulation factors, especially for newborns who  
75 are at risk of intracranial haemorrhage, and for paediatric patients who have poor venous access  
76 [8].

77 Intranasal delivery (IND) is receiving increased attention as a potential non-invasive  
78 method capable of delivering therapeutically relevant concentrations of many different  
79 substances, including large biologics, in preclinical and clinical settings [9–11]. In addition, IND  
80 might be the preferred choice over oral administration of biologics as it provides advantages over  
81 other routes: easy self-administration and dose adjustment, rapid onset of effects, avoidance of  
82 hepatic first pass elimination, avoidance of the extremely low pH and digestive enzymes in the  
83 gastrointestinal tract [12], and potential direct pathways to the central nervous system that bypass  
84 the blood brain barrier [13].

85 Among the elements involved in mucosal bioavailability, a ubiquitous receptor seems to  
86 play a major role in the capture of drugs: the neonatal receptor for the fragment crystallisable (Fc)  
87 region of immunoglobulin (FcRn) [14]. This receptor acts as transporter, allowing the active  
88 passage of substances through the epithelial barrier [15–17]. Two EHL-rFIX products, genetically  
89 fused to the Fc fragment of immunoglobulin (rFIX-Fc) or to mature albumin [18,19],  
90 demonstrated an EHL. This is due to a delay in protein degradation following FcRn binding,  
91 which allows the recycling of the products back into the blood circulation [20,21]. Therefore, we  
92 hypothesised that rFIX, and particularly EHL-FIX such as rFIX-Fc, could be delivered through  
93 IND for the treatment of HB.

94 The aim of this proof-of-concept study was to evaluate the effectiveness of rFIX (SHL-  
95 rFIX and EHL-rFIX) IND in mice.

## 96 **2. Materials and Methods**

### 97 ***2.1 Intranasal delivery***

98 The animal study protocols were approved by the local Animal Ethics Evaluation  
99 Committee (CECCAPP: C2EA-15) and authorised by the French Ministry of Education and  
100 Research (protocol code APAFIS #36194-2022010421473996 v7, approved in 2022). Male and  
101 female wild type C57BL/6J mice (WT), and transgenic mice with C57BL/6J background that  
102 were either FcRn knock-out (FcRn KO), FcRn KO and humanised for FcRn (hFcRn), or FIX KO  
103 were purchased from the Charles River Laboratory (Les Oncins, Saint Germain Nuelles, France).  
104 All mice were either 8-12 weeks or 76 weeks to evaluate age differences. Recombinant rFIX  
105 (Nonacog alfa, BENEFIX<sup>®</sup>, Pfizer, New-York, USA), and rFIX-Fc (Eftrenonacog alfa,  
106 ALPROLIX<sup>®</sup>, SOBI, Stockholm, Sweden) were kindly provided by the respective companies or  
107 purchased. For IND studies, the identity of the factors was blinded to the investigator that  
108 performed the experiments. Mice were weighed (verification of sufficient weight 20-30g), and  
109 then anaesthetised by intraperitoneal injection (mixture of ketamine and xylazine) to obtain  
110 sedation and an analgesic effect. A maximum volume of 10 $\mu$ L was administered as a drop into  
111 each nostril (20 $\mu$ L of one biologic corresponding to 10IU for a 20-30g mice). Sham treatment  
112 consisted of a saline solution. Three IU of rFIX and rFIX-Fc were also administered via IV  
113 injection in the retro-orbital vein of mice that served as controls.

### 114 ***2.2 FIX detection and measurement***

115 Blood samples were collected at different time points after IV (15min, 4h and 24h) and  
116 IND (15min) from exsanguination following decapitation on anaesthetised mice. Blood samples  
117 were centrifuged (15min, 3500rpm) at room temperature (RT) and frozen (-20°C) for further  
118 analysis. Plasma FIX antigen levels (FIX:Ag) were quantified using the Asserachrom<sup>®</sup> IX:Ag  
119 (Stago, New Jersey, USA) enzyme-linked immunosorbent assay kit, as described previously  
120 [22,23]. FIX:C was measured using a validated chromogenic assay [24] (Biophen Hyphen  
121 Biomed, Neuville-sur-Oise, France). Murine plasma samples were loaded onto a Mini-Protean  
122 TGX 4-15% Gel (Biorad<sup>™</sup>) for electrophoresis under reducing conditions (Tris 25mmol/L,  
123 glycine 192mmol/L, SDS 0.1%, pH 8.3 running buffer) and then transferred onto a nitrocellulose  
124 membrane (Trans-Blot Turbo Mini 0.2 $\mu$ m NC Transfer pack, Biorad) according to the  
125 manufacturer's instructions. The nitrocellulose membrane was then blocked with 6% skimmed  
126 milk-PBS and exposed to horseradish peroxidase (HRP)-conjugated affinity-purified goat  
127 anti-human FIX (1mg/mL) IgG (1:2000 dilution; Affinity Biologicals, Ancaster, Canada).

### 128 ***2.3 Histological study***

129 The nasal cavities from each animal were taken to perform histological studies on  
130 turbinate tissue sections. Under gentle agitation, samples were first fixed in 4% PFA for 3days at  
131 RT, then decalcified at 4°C in 10% EDTA (Sigma, St. Louis, MO, USA) at pH 7.4 for 7days, and  
132 cryopreserved at 4°C in sucrose 30% (Sigma) for 3days. After immersion in optimum cutting

133 temperature compound (OCT, TissueTek, Sakura Finetek, The Netherlands), the samples were  
134 quickly frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processing. Sagittal sections, 8- $\mu\text{m}$  thick, were performed  
135 using a cryostat microtome (CM1860, Leica). Sections were successively incubated at RT with  
136 acetone, 3% hydrogen peroxide (Sigma), PBS containing 3% bovine serum albumin and 5%  
137 normal goat serum, and for 1h with HRP-conjugated anti-FIX antibody (1:100, goat polyclonal,  
138 Cedarlane, Burlington, Canada). HRP was revealed using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)  
139 substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were counterstained with  
140 Hematoxylin QS (Vector Laboratories), mounted with Glycergel (Agilent Technologies, Santa  
141 Clara, CA, USA). Images of nasal sections were captured using an inverted microscope (40x oil  
142 lens and 10 $\mu\text{m}$  scale bar, Nikon Ti-E microscope).

#### 143 **2.4 Statistics**

144 All experiments were carried out at least in duplicate. Data are presented with a logarithm  
145 scale for FIX:Ag plasma levels (ng/ml) and FIX:C (IU/dL) and expressed using means  $\pm$  standard  
146 error of the mean (SEM). Statistical analyses were done using GraphPad Prism 8 software by  
147 unpaired t test or two-ways analysis of variance (ANOVA) test (Dunnett's), with p-value  $<0.05$   
148 considered statistically significant.

149

### 150 **3. Results and discussion**

151 As control, 20-30 g WT mice first received IV administration of 3IU ( $\sim 100$ -150IU/kg) of  
152 rFIX or rFIX-Fc (n=22). This resulted in plasma FIX:Ag levels of  $2066 \pm 275$  ng/ml and  $2259$   
153  $\pm 345$  ng/ml, respectively, at 15min post-IV administration (Figure 1A). There was no statistical  
154 difference between rFIX and rFIX-Fc regarding FIX:Ag levels (p=0.591, p=0.292, and p=0.083,  
155 at 15min, 4h, and 24h post-administration, respectively), and pharmacokinetics up to 24h post-IV  
156 administration were comparable, as previously described [20].

157 Although advantages of IND have been demonstrated for small molecules such as  
158 sumatriptan, oxytocin, insulin, and others [10,11,25], it is not yet clear whether molecules with  
159 higher molecular weight could also be administered effectively via the nasal route, through a  
160 passive or receptor-dependent pathway [17]. Therefore, a total of 95 (85 were 8-12weeks old and  
161 10 were older) mice of 4 different strains (WT, hFcRn, FcRn KO, and FIX KO) were used to  
162 study the IND of two high-molecular weight proteins, rFIX (55 kDa) and rFIX-Fc (98 kDa) [1,20].  
163 Fifteen minutes after IND of 10IU per mice ( $\sim 330$ -500 IU/kg), plasma FIX:Ag levels in WT mice  
164 were  $1063 \pm 323$  ng/ml for rFIX and  $1476 \pm 316$  ng/ml for rFIX-Fc (p=0.823; Figure 1B). The  
165 bioavailability after IND was approximately 5- to 6-times lower compared to IV administration.  
166 Longer time points (4h and 24h) were tested (n=6) but FIX:Ag levels were undetectable, and  
167 experiments not pursued (data excluded from the analysis).

168 FcRn has been described as playing a key role in the mucosal uptake of biologics [26].  
169 However, the absence of significant differences between rFIX and rFIX-Fc regarding FIX:Ag

170 levels 15min post-IND in WT mice suggests that the uptake is independent of FcRn. The nasal  
171 mucosal uptake of rFIX and rFIX-Fc was thus tested in two FcRn transgenic mouse models, one  
172 that lacks the expression of murine FcRn (FcRn KO) and one that expresses human FcRn (hFcRn)  
173 instead. No significant difference in FIX:Ag levels was observed between hFcRn and FcRn KO  
174 mice compared to WT mice for both rFIX and rFIX-Fc; FIX:Ag levels after rFIX-Fc IND were  
175  $1328 \pm 398$  ng/ml in hFcRn and  $1673 \pm 463$  ng/ml in FcRn KO mice ( $p=0.279$  et  $p=0.354$ ,  
176 respectively; Figure 1B). This confirms that rFIX and rFIX-Fc mucosal uptakes were not  
177 dependent on FcRn.

178         Histological analyses of nasal mucosa after rFIX and rFIX-Fc IND were performed. As  
179 shown in Figure 2, there were no significant differences between strains (WT, hFcRn, FcRn KO,  
180 FIX KO) nor biologics tested (rFIX vs rFIX-Fc), supporting the hypothesis that mucosal uptake  
181 of rFIX and rFIX-Fc is mostly passive, using a paracellular mechanism.

182         Then, to ensure that the low pH of the nasal mucosa (6.5) does not alter rFIX and rFIX-  
183 Fc proteins, we performed Western blot analysis on the plasma of treated mice. Both rFIX and  
184 rFIX-Fc proteins were found with a single band at their expected molecular weight at 55kDa and  
185 98kDa, respectively (Figure 3A and 3B), confirming that mucosal uptake of rFIX or rFIX-Fc did  
186 not alter FIX proteins, irrespective of the mouse strain tested, including FIX KO mice (FIX:Ag  
187 levels were  $891 \pm 458$  ng/ml after rFIX-Fc IND, and  $1039 \pm 339$  ng/ml after rFIX,  $p=0.237$ ). In  
188 addition, FIX:C levels were measured at 15min after IND in FIX KO mice. FIX:C was  $48.7 \pm 19.5$   
189 IU/dL for rFIX and  $30.8 \pm 7.4$  IU/dL for rFIX-Fc ( $p=0.421$ ; Figure 3D), which was consistent with  
190 the FIX:Ag levels measured in these same FIX KO mice (Figure 3C). Results were similar in 8-  
191 12-week-old and 76-week-old mice (WT ( $n=5$ ) and hFcRn ( $n=5$ ), data not presented in Figure 1).

192         Overall, these results showed that IND of rFIX and rFIX-Fc is effective in increasing  
193 plasma FIX:Ag and FIX:C levels in mice and could be considered as an alternative to IV  
194 administration for the treatment of HB. The variability of plasma FIX:Ag levels after IND was  
195 high in all mouse strains (Figure 1B), suggesting that the variability of response depends on the  
196 methodology used for IND. Both the duration of exposure and the position of the material in the  
197 nasal cavity may determine the success of the administration method [27]. Optimisation and  
198 standardisation of the IND method is therefore needed to lower the variability of response and  
199 ensure optimal and repeatable effectiveness for further development in larger animal models and  
200 humans. Recently, the use of a polymeric biodegradable film has been described in mice, and was  
201 reported as reproducible [27]. The latter was used with the desire of a nose-to-brain administration  
202 as IND is known to be a valuable tool for administering drugs targeting the brain [25,28].  
203 Enhancing brain uptake of rFIX proteins may be of particular interest in the context of HB where  
204 the incidence of intracranial haemorrhage is higher than in the non-haemophilia population,  
205 especially in neonates [8]. Further studies in neonatal mice will be required to evaluate the impact  
206 of an immature nasal mucosa on mucosal uptake, safety, and biodistribution of rFIX and rFIX-Fc

207 following IND. Here, we showed that molecules with molecular weight up to 98kDa can reach  
208 the blood compartment following IND. Therefore, it is likely that IND could also be applied to  
209 other rFIX molecules, such as rFIX fused to albumin as it has a similar molecular weight and  
210 mechanism of action than rFIX-Fc, or to other coagulation factors for the treatment of other  
211 bleeding disorders including recombinant FVIII proteins for haemophilia A, recombinant  
212 activated factor VII for factor VII deficiency or Glanzmann thrombasthenia [29].

213         This study showed the proof-of-concept that IND is a non-invasive route of  
214 administration that may be developed as an alternative for delivering coagulation factors for the  
215 treatment of bleeding disorders such as HB. Additional pre-clinical studies are required to  
216 optimise the methodology of IND and further characterise the efficacy and safety of such an  
217 approach in the context of HB. If proven safe and effective for preventing and treating bleeds, we  
218 strongly believe that using IND may considerably improve patients' and caregivers' quality of  
219 life.

220 **4. Declarations**

221 **Author contributions:** All authors contributed to the study conception and design as well as the  
222 drafting of the article. MF was responsible for statistical analysis of data. SLQ and CM revised it  
223 critically for important intellectual content, and all authors gave final approval of the version to  
224 be submitted.

225

226 **Acknowledgments:** Authors wish to thank all individuals who provided support during the  
227 research including the University Claude Bernard Lyon I. We thank Véréna Landel (Direction de  
228 le Recherche en Santé, Hospices Civils de Lyon) for her help in manuscript preparation and  
229 Cynthia Garapon for technical assistance.

230

231 **Competing interests:** SLQ has received grant/research support from CSL Behring, honoraria  
232 from SOBI, Roche, LFB Biomedicaments, Octapharma, NovoNordisk, and is currently a full-  
233 time employee at CSL Behring. All other authors have no competing interests in relation to this  
234 work.

235

236 **Funding:** This work was partly supported by a grant from “Fond de dotation France”, CSL  
237 Behring, the non-profit organization EURECa, University Claude Bernard Lyon I, the Société  
238 Française d’Oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale (SFORL) and Amplifon.

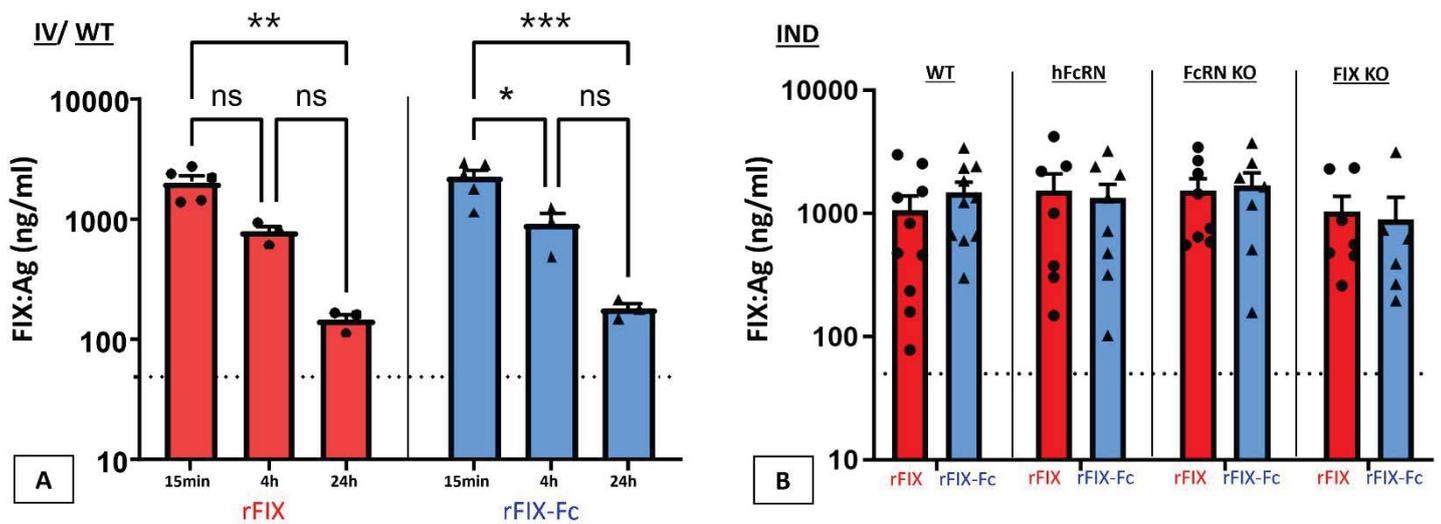
239

**References**

- 240 1 Mancuso ME, Mahlangu JN, Pipe SW. The changing treatment landscape in haemophilia:  
241 from standard half-life clotting factor concentrates to gene editing. *Lancet Lond Engl* 2021;  
242 **397**: 630–40.
- 243 2 Bolton-Maggs PHB, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet Lond Engl* 2003; **361**: 1801–9.
- 244 3 Nederlof A, Kitchen S, Meijer P, Cnossen M, Ali Pour N, Kershaw G, Jennings I, Walker I,  
245 de Maat MPM. Performance of factor IX extended half-life product measurements in  
246 external quality control assessment programs. *J Thromb Haemost JTH* 2020; **18**: 1874–83.
- 247 4 Arya S, Siad FM, Wilton P, Page D, Boma-Fischer L, Floros G, Winikoff R, Teitel J,  
248 Sholzberg M. Invisible bleeds: Lived experiences and barriers to care for men with  
249 hemophilia. *J Thromb Haemost JTH* 2022; **20**: 296–306.
- 250 5 Le Quellec S, Enjolras N, Perot E, Girard J, Negrier C, Dargaud Y. Fusion of Factor IX to  
251 Factor XIII-B Sub-Unit Improves the Pharmacokinetic Profile of Factor IX. *Thromb*  
252 *Haemost* 2018; **118**: 2053–63.
- 253 6 Perot E, Enjolras N, Le Quellec S, Indalecio A, Girard J, Negrier C, Dargaud Y. Expression  
254 and characterization of a novel human recombinant factor IX molecule with enhanced in  
255 vitro and in vivo clotting activity. *Thromb Res* 2015; **135**: 1017–24.
- 256 7 Pipe SW, Leebeek FWG, Recht M, Key NS, Castaman G, Miesbach W, Lattimore S,  
257 Peerlinck K, Van der Valk P, Coppens M, Kampmann P, Meijer K, O’Connell N, Pasi KJ,  
258 Hart DP, Kazmi R, Astermark J, Hermans CRJR, Klamroth R, Lemons R, et al. Gene  
259 Therapy with Etranacogene Dezaparvovec for Hemophilia B. *N Engl J Med* 2023; **388**:  
260 706–18.
- 261 8 Zanon E, Pasca S, Demartis F, Tagliaferri A, Santoro C, Cantori I, Molinari AC, Biasoli C,  
262 Coppola A, Luciani M, Sottilotta G, Ricca I, Pollio B, Borchellini A, Tosetto A, Peyvandi  
263 F, Frigo AC, Simioni P. Intracranial Haemorrhage in Haemophilia Patients Is Still an Open  
264 Issue: The Final Results of the Italian EMO.REC Registry. *J Clin Med* 2022; **11**: 1969.
- 265 9 Heni M, Wagner R, Kullmann S, Veit R, Mat Husin H, Linder K, Benkendorff C, Peter A,  
266 Stefan N, Häring H-U, Preissl H, Fritsche A. Central insulin administration improves  
267 whole-body insulin sensitivity via hypothalamus and parasympathetic outputs in men.  
268 *Diabetes* 2014; **63**: 4083–8.
- 269 10 Brambilla M, Manenti R, de Girolamo G, Adenzato M, Bocchio-Chiavetto L, Cotelli M.  
270 Effects of Intranasal Oxytocin on Long-Term Memory in Healthy Humans: A Systematic  
271 Review. *Drug Dev Res* 2016; **77**: 479–88.
- 272 11 Winner P, Rothner AD, Saper J, Nett R, Asgharnejad M, Laurenza A, Austin R, Peykamian  
273 M. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of sumatriptan nasal spray in the  
274 treatment of acute migraine in adolescents. *Pediatrics* 2000; **106**: 989–97.
- 275 12 Bern M, Nilsen J, Ferrarese M, Sand KMK, Gjølborg TT, Lode HE, Davidson RJ, Camire  
276 RM, Bækkevold ES, Foss S, Grevys A, Dalhus B, Wilson J, Høydahl LS, Christianson GJ,  
277 Roopenian DC, Schlothauer T, Michaelsen TE, Moe MC, Lombardi S, et al. An engineered  
278 human albumin enhances half-life and transmucosal delivery when fused to protein-based  
279 biologics. *Sci Transl Med* 2020; **12**.
- 280 13 Kumar NN, Lochhead JJ, Pizzo ME, Nehra G, Boroumand S, Greene G, Thorne RG.  
281 Delivery of immunoglobulin G antibodies to the rat nervous system following intranasal

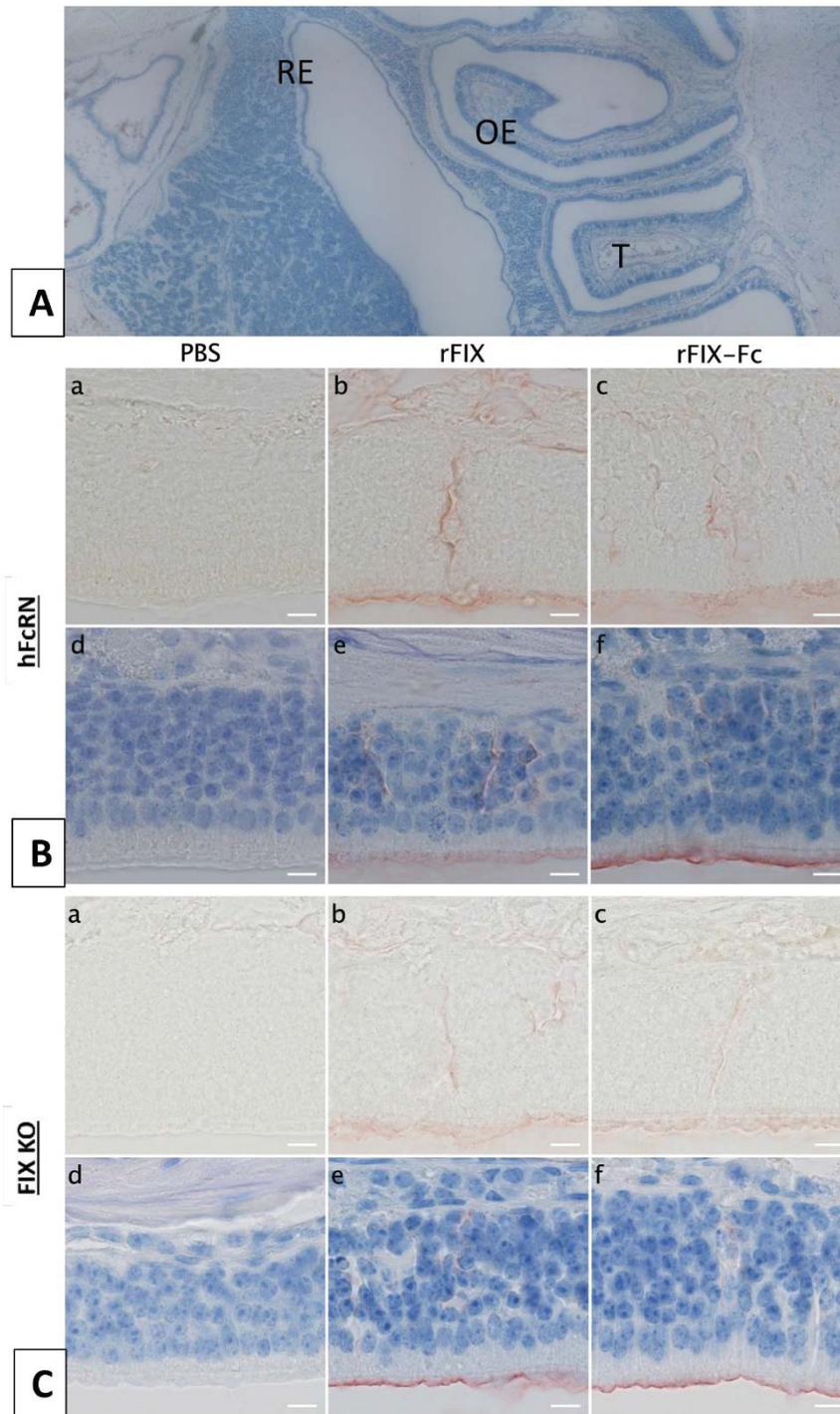
- 282 administration: Distribution, dose-response, and mechanisms of delivery. *J Control Release*  
283 *Off J Control Release Soc* 2018; **286**: 467–84.
- 284 14 Challa DK, Velmurugan R, Ober RJ, Sally Ward E. FcRn: from molecular interactions to  
285 regulation of IgG pharmacokinetics and functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; **382**:  
286 249–72.
- 287 15 Gould JC, Carvajal I, Davidson T, Graham J, Hillegass J, Julien S, Kozhich A, Wang B,  
288 Wei H, Yamniuk AP, Mathias N, Haggerty HG, Graziano M. Bioavailability of protein  
289 therapeutics in rats following inhalation exposure: Relevance to occupational exposure limit  
290 calculations. *Regul Toxicol Pharmacol RTP* 2018; **100**: 35–44.
- 291 16 Bequignon E, Dhommée C, Angely C, Thomas L, Bottier M, Escudier E, Isabey D, Coste  
292 A, Louis B, Papon J-F, Gouilleux-Gruart V. FcRn-Dependent Transcytosis of Monoclonal  
293 Antibody in Human Nasal Epithelial Cells In Vitro: A Prerequisite for a New Delivery  
294 Route for Therapy? *Int J Mol Sci* 2019; **20**.
- 295 17 Fieux M, Le Quellec S, Bartier S, Coste A, Louis B, Giroudon C, Nourredine M,  
296 Bequignon E. FcRn as a Transporter for Nasal Delivery of Biologics: A Systematic Review.  
297 *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 6475.
- 298 18 Shapiro AD, Ragni MV, Valentino LA, Key NS, Josephson NC, Powell JS, Cheng G,  
299 Thompson AR, Goyal J, Tubridy KL, Peters RT, Dumont JA, Ewart D, Li L, Hallén B,  
300 Gozzi P, Bitonti AJ, Jiang H, Luk A, Pierce GF. Recombinant factor IX-Fc fusion protein  
301 (rFIXFc) demonstrates safety and prolonged activity in a phase 1/2a study in hemophilia B  
302 patients. *Blood* 2012; **119**: 666–72.
- 303 19 Santagostino E, Negrier C, Klamroth R, Tiede A, Pabinger-Fasching I, Voigt C, Jacobs I,  
304 Morfini M. Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking  
305 coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients. *Blood* 2012; **120**:  
306 2405–11.
- 307 20 Peters RT, Low SC, Kamphaus GD, Dumont JA, Amari JV, Lu Q, Zarbis-Papastoitsis G,  
308 Reidy TJ, Merricks EP, Nichols TC, Bitonti AJ. Prolonged activity of factor IX as a  
309 monomeric Fc fusion protein. *Blood* 2010; **115**: 2057–64.
- 310 21 Chia J, Louber J, Glauser I, Taylor S, Bass GT, Dower SK, Gleeson PA, Verhagen AM.  
311 Half-life-extended recombinant coagulation factor IX-albumin fusion protein is recycled via  
312 the FcRn-mediated pathway. *J Biol Chem* 2018; **293**: 6363–73.
- 313 22 Nathwani AC, Davidoff A, Hanawa H, Zhou JF, Vanin EF, Nienhuis AW. Factors  
314 influencing in vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing  
315 the human factor IX cDNA. *Blood* 2001; **97**: 1258–65.
- 316 23 Nathwani AC, Davidoff AM, Hanawa H, Hu Y, Hoffer FA, Nikanorov A, Slaughter C, Ng  
317 CYC, Zhou J, Lozier JN, Mandrell TD, Vanin EF, Nienhuis AW. Sustained high-level  
318 expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-  
319 associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood* 2002; **100**: 1662–9.
- 320 24 Schmitt C, Adamkewicz JI, Xu J, Petry C, Catalani O, Young G, Negrier C, Callaghan MU,  
321 Levy GG. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Emicizumab in Persons with  
322 Hemophilia A with Factor VIII Inhibitors: HAVEN 1 Study. *Thromb Haemost* 2021; **121**:  
323 351–60.

- 324 25 Benedict C, Hallschmid M, Schmitz K, Schultes B, Ratter F, Fehm HL, Born J, Kern W.  
325 Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart.  
326 *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2007; **32**: 239–43.
- 327 26 Song X, Li R, Deng H, Li Y, Cui Y, Zhang H, Dai W, He B, Zheng Y, Wang X, Zhang Q.  
328 Receptor mediated transcytosis in biological barrier: The influence of receptor character  
329 and their ligand density on the transmembrane pathway of active-targeting nanocarriers.  
330 *Biomaterials* 2018; **180**: 78–90.
- 331 27 Balafas EG, Papakyriakopoulou PI, Kostomitsopoulos NG, Valsami GN. Intranasal  
332 Administration of a Polymeric Biodegradable Film to C57BL/6 Mice. *J Am Assoc Lab*  
333 *Anim Sci JAALAS* 2023; **62**: 179–84.
- 334 28 Ladel S, Flamm J, Zadeh AS, Filzwieser D, Walter J-C, Schlossbauer P, Kinscherf R,  
335 Lischka K, Luksch H, Schindowski K. Allogenic Fc Domain-Facilitated Uptake of IgG in  
336 Nasal Lamina Propria: Friend or Foe for Intranasal CNS Delivery? *Pharmaceutics* 2018;  
337 **10**.
- 338 29 Metzner HJ, Pipe SW, Weimer T, Schulte S. Extending the pharmacokinetic half-life of  
339 coagulation factors by fusion to recombinant albumin. *Thromb Haemost* 2013; **110**: 931–9.

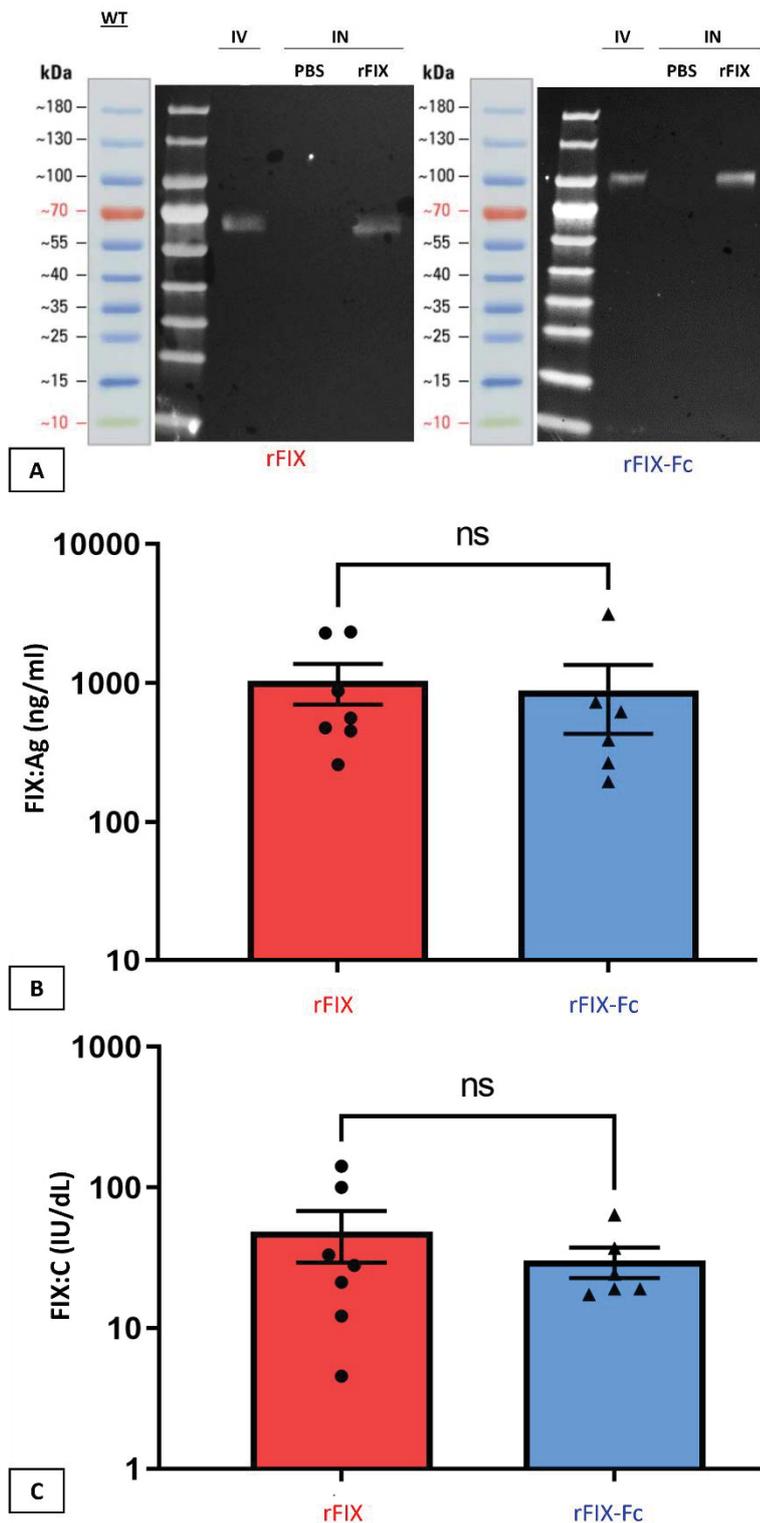
340 **Figure legends**341 **Figure 1. Plasma FIX:Ag levels of rFIX and rFIX-Fc after IV and IND.**

342 *Legend: (A) Kinetics of plasma rFIX and rFIX-Fc concentration 15 min, 4h, and 24h after IV*  
 343 *administration in WT mice. Each symbol corresponds to an individual. N=3-5. (B) rFIX and rFIX-Fc*  
 344 *concentrations 15min after IND in several mouse strains. Each symbol corresponds to an individual. N=7-*  
 345 *10. One-way ANOVA statistical analysis was applied and completed by a Dunnett's multiple comparison*  
 346 *test. Data are presented as mean ± SEM.*

347 *Abbreviations: FcRn, Neonatal Receptor of Fc fragment of Immunoglobulin; hFcRn, humanised strains for*  
 348 *FcRn; KO, knock-out; ns, non-significant ( $p>0.05$ ); rFIX, recombinant factor IX (SHL-rFIX); rFIX-Fc,*  
 349 *recombinant factor IX fused with the Fc fragment of an immunoglobulin (EHL-rFIX); WT, wild type.*



350 **Figure 2. rFIX and rFIX-Fc histological analysis of the mucosal uptake after IND.**  
 351 *Legend: (A) Section of the nasal cavity with respiratory epithelium (RE), olfactory epithelium (OE), and*  
 352 *turbinate (T) visible; (B) Section of the olfactory epithelium of a humanised FcRn mouse: absence of*  
 353 *labelling on the control sections (a and d); a strong labelling on the outer side of the epithelium within the*  
 354 *mucus covering the ciliated cell layer was observed, as well as between the sustentatory cells and neurons*  
 355 *up to the lamina propria, and in the vasculature, showing evidence of passive passage with no clear*  
 356 *differences between rFIX and rFIX-Fc (b vs c; e vs f). (C) Section of the olfactory epithelium of a FIX KO*  
 357 *mouse: similar results on the control sections (a and d), on the rFIX section (b and e) and on the rFIX-Fc*  
 358 *section (c and f) with no clear differences between rFIX and rFIX-Fc (b vs c; e vs f). In the respiratory*  
 359 *epithelium, the labelling of rFIX and rFIX-Fc was punctiform and of low intensity; data are not presented.*  
 360 *Experiments were performed on 3 mice for each strain to confirm reproducibility but results from only one*  
 361 *mouse are shown.*



362

363

**Figure 3: rFIX and rFIX-Fc protein expression and FIX:Ag and FIX:C levels after IND**

364

Legend: Both rFIX and rFIX-Fc proteins were found with a single band at their expected molecular weight at 55kDa and 98kDa in wild type mice, respectively (A). FIX:Ag plasma levels (B) and FIX clotting activity (FIX:C) in IU/dL (C) of rFIX and rFIX-Fc of the FIX KO mice (n=7 and n=6 for rFIX and rFIX-Fc, respectively). Unpaired t test was performed. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

366

Abbreviations: FcRn, Neonatal Receptor of Fc fragment of Immunoglobulin; hFcRn, humanised strains for FcRn; IN, intranasal; KO, knock-out; ns, non-significant ( $p > 0.05$ ); rFIX, recombinant factor IX (SHL-rFIX); rFIX-Fc, recombinant factor IX fused with the Fc fragment of an immunoglobulin (EHL-rFIX); WT, wild type.

367

368

369

370

371

## 8. Synthèse et Discussion

L'intérêt du FcRn *in vitro* pour le passage à travers l'épithélium nasal d'une biothérapie, l'inflximab, a été démontré par mes directeurs de thèse (Bequignon *et al.* 2019). Faisant suite à ces travaux, j'ai réalisé une revue systématique de la littérature sur la place du FcRn dans l'administration nasale de biothérapies, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Puis en collaboration avec le Dr. Claire Monge et le Dr. Sandra Le Quellec du LBTI (UMR CNRS), nous avons étudié le passage transmuqueux de l'Eftrenonacog alfa *in vivo* sur des modèles murins. Un total de 101 souris de 4 souches différentes (WT, hFcRn, FcRn KO et FIX KO) a été utilisé pour étudier l'administration par voie nasale de deux protéines de poids moléculaire élevé, rFIX (55 kDa) et rFIX-Fc (98 kDa). J'ai démontré grâce à des souris transgéniques que l'administration nasale de FIX était possible et FcRn indépendante. Nous avons montré que peu importe le poids moléculaire de la biothérapie ou l'âge des souris, le passage transmuqueux était possible. A l'inverse, les modalités de l'administration nasale étaient fondamentales, chaque paramètre étant à l'origine d'une grande variabilité. Ensuite, nous avons montré que l'activité du FIX après son passage était conservée à l'aide de dosage chromogénique. C'est la première fois que l'efficacité et la tolérance de l'administration nasale de rFIX et de rFIX-Fc est démontrée *in vivo*. Cette étude qui fait « la preuve du concept » est une condition préalable à des tests de coagulation chez des souris HB et ensuite à l'étude de l'administration nasale de FAH chez l'Homme. L'épithélium nasal devient la nouvelle voie d'administration des FAH, rendant accessible les traitements à la demande et/ou prophylactique, en éliminant les difficultés d'accès aux soins, ou les problèmes d'abord veineux.

### Le FcRn est-il nécessaire pour l'administration IN de biothérapies dans l'HB ?

Parmi les 12 études incluses dans la revue systématique, seulement six ont confirmé l'expression de FcRn dans les cellules épithéliales des voies aériennes supérieures (Bequignon *et al.* 2019; Heidl *et al.* 2016; Ladel *et al.* 2018; 2019; L. Lu *et al.* 2011; Ye *et al.* 2011). Il est donc licite de s'interroger sur sa nécessité pour le passage transmuqueux de biothérapies. En effet, l'utilisation de rFIX ou de rFIX-Fc n'a pas modifié l'importance du passage transmuqueux, alors que le FcRn est censé reconnaître le Fc permettant ainsi la liaison FcRn-Fc à pH acide (Roopenian et Akilesh 2007). De plus, l'idée que le transport d'IgG soit uniquement dépendant du FcRn a été exclue car son insensibilité à la déglycosylation des Fc a été prouvée (Ladel *et al.* 2019; Sockolosky et Szoka 2015; Wada, Matsui, et Kawasaki 2019). En revanche, la fusion rFIX et Fc a fait la preuve de son efficacité pour l'allongement de la demi-vie du rFIX, donc le recyclage des Ig semble bien FcRn dépendant (Shapiro *et al.* 2012). L'absence de rôle mis en évidence par le FcRn pourrait être expliqué par les variations d'expression du récepteur car il n'est pas exprimé dans toutes les cellules épithéliales (Cianga *et al.* 2011). Une autre explication est le mécanisme. Nous avons effectué des analyses histologiques de la muqueuse nasale après IND. Les résultats étaient similaires, sans différence significative entre les souches (WT, hFcRn, FcRn KO ou FIX KO) et les produits biologiques testés (rFIX vs rFIX-Fc), ce qui confirme que l'absorption de rFIX et de rFIX-Fc par les muqueuses est essentiellement passive, par le biais d'un mécanisme paracellulaire. Cela remet en question l'idée d'un recyclage des Ig uniquement possible grâce à leur fragment Fc. Le développement de molécules de fusion semble nécessaire pour allonger leur demi-vie, mais, a priori, le développement de leur administration par voie IN ne le requiert pas. Au total, bien que l'idée que le transport transmuqueux de biothérapies soit uniquement FcRn dépendant ait été écartée par nos travaux *in vivo*, il est trop tôt pour se passer de ce récepteur ubiquitaire qui a fait la preuve de son efficacité dans les molécules thérapeutiques à demi-vie allongée comme le rFIX-Fc.

### **Le modèle murin de souris transgénique est-il adapté pour évaluer l'importance du FcRn ?**

Les variations des résidus du site d'interaction du FcRn avec les Ig d'une espèce à l'autre entraînent des différences nécessitant d'être précautionneux dans le choix des modèles pré-cliniques utilisés (Oganesyan *et al.* 2014; Ober *et al.* 2001; Martin *et al.* 2001). Les modèles murins ayant une affinité très élevée pour le FcRn et des niveaux d'IgG plus faible que chez l'Homme, la compétition au niveau du site de liaison du FcRn est plus faible (Gurbaxani, Dostalek, et Gardner 2013) ce qui compromet la pertinence des souris sauvages en tant que modèles d'étude de la PK/PD (Valente *et al.* 2020; Vaccaro *et al.* 2006). Les primates non humains, en particulier les singes *cynomolgus*, sont des modèles de choix pour étudier la dynamique des FcRn en raison de leur capacité relativement robuste à reproduire les paramètres PK/PD humains (Valente *et al.* 2020; Carter et Lazar 2018). Cependant, les contraintes financières et éthiques sont majeures, et il n'existe que deux modèles animaux déficients en FIX, le chien et la souris. A ce jour, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été développés permettant de reproduire une dynamique du FcRn semblable à celle de l'homme (C.-H. Lee *et al.* 2019; T. Li et Balthasar 2018; Proetzel, Wiles, et Roopenian 2014; Roopenian, Christianson, et Sproule 2010; Avery *et al.* 2016). Les souris hFcRn, FcRn KO, FIX KO (HB) ont permis l'étude du mécanisme de passage transmuqueux du rFIX-Fc dans ce travail, validant leurs utilisations dans le futur.

### **Quels facteurs doivent être pris en compte pour étudier l'administration nasale de biothérapies ?**

Il est bien connu que l'interaction FcRn/IgG dépend fortement du pH. Le FcRn se lie à l'IgG avec des affinités nanomolaires à un pH de 6,5-6,0, que l'on trouve dans les vésicules intracellulaires, et présente des interactions négligeables à un pH de 7,4-7,0 (Ober *et al.* 2001), ce qui permet la libération de l'IgG dans la circulation sanguine (Martin *et al.* 2001). Le pH de la couche muqueuse du nez serait d'environ 6, ce qui était un argument en faveur de l'utilisation de la voie nasale (England *et al.* 1999). Cependant, l'influence du pH sur l'efficacité de la transcytose n'est que très rarement rapportée (seulement 1 des 6 études *in vivo* incluses dans ma revue systématique) (Bern *et al.* 2020; Rawool *et al.* 2008; L. Lu *et al.* 2011; Ye *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2018; Bitsaktsis, Babadjanova, et Gosselin 2015). En revanche, *in vitro*, Bequignon *et al.* avaient clairement démontré qu'un pH acide (pH = 6) était nécessaire pour une transcytose efficace (Bequignon *et al.* 2019). Ensuite, se pose la question du poids moléculaire. Bien que les avantages de l'administration IN aient été démontrés pour de petites molécules telles que le sumatriptan, l'ocytocine, l'insuline et d'autres (Benedict *et al.* 2007; Brambilla *et al.* 2016; Winner *et al.* 2000), on ne voit pas encore clairement si des molécules de poids moléculaire plus élevé pourraient également être administrées efficacement par voie nasale, par une voie passive ou dépendante des récepteurs. Nous avons mis en évidence que l'administration IN de protéines de haut poids moléculaire était possible, passive et FcRn indépendante. Les protéines rFIX et rFIX-Fc ont été identifiées en western blot, avec une bande unique à 55kDa et à 98kDa, respectivement ; confirmant que l'absorption muqueuse de rFIX ou rFIX-Fc n'a pas altéré leur structure, indépendamment de la souche de souris testée, y compris les souris FIX KO. D'autres facteurs limitants, comme la perméabilité de la membrane et la CMC pourraient jouer un rôle (Ladel *et al.* 2019). La dégradation ou la modification des produits biologiques au cours de l'aérosolisation pourraient aussi entraîner une perte d'affinité de liaison pour le FcRn. Cependant, dans ce travail, le FIX était déposé en gouttelettes pour réduire ce risque. La température est un autre facteur susceptible de modifier l'interaction FcRn-Fc (Ward, Devanaboyina, et Ober 2015), mais il n'a pas été évalué dans ce travail, l'objectif étant d'optimiser l'administration IN sans s'éloigner des conditions futures d'administration du médicament, la température correspondait donc à la température corporelle des souris. La durée de l'exposition et la position du matériel dans la cavité nasale peuvent également déterminer le succès de la méthode d'administration (Balafas *et al.* 2023). L'optimisation et la normalisation de la méthode d'administration IN sont donc nécessaires pour réduire l'hétérogénéité des réponses, garantissant efficacité et reproductibilité en vue d'un développement sur modèles animaux plus grands et chez l'Homme.

### **Quelles fonctionnalités sont conservées par la biothérapie après passage transmuqueux ?**

Après avoir prouvé que l'administration nasale était possible, la question de l'état de la molécule après passage transmuqueux s'est posée. Les résultats des analyses protéiques et chromogéniques ont permis de se rassurer quant au maintien des propriétés du FIX après administration nasale. Ces résultats sont cohérents avec ceux décrits au niveau cérébral par Kumar *et al* (Kumar *et al.* 2018). L'efficacité de l'immunisation dans un modèle de souris infectées par des virus vont dans le même sens (Rawool *et al.* 2008; L. Lu *et al.* 2011; Ye *et al.* 2011; Bitsaksis, Babadjanova, et Gosselin 2015). Ainsi, nous confirmons l'hypothèse initiale que l'administration IN est efficace et que les produits biologiques semblent conserver leur intégrité après avoir atteint la circulation systémique. La question du rapport entre la quantité administrée et la concentration plasmatique persistait, ce pourquoi nous avons utilisé la voie IV comme référence pour définir les paramètres PK. En moyenne, la biodisponibilité après administration IN était environ 5 à 6 fois inférieure à celle de l'administration IV. Ces résultats ne sont pas concordants avec ceux de Kumar *et al.* qui a rapporté une concentration intracérébrale plus élevée après administration IN qu'après une administration IV (Kumar *et al.* 2018). Ces résultats ont été obtenus après une administration unique et la réalisation d'administrations répétées doit être évaluée pour optimiser la quantité qui pourrait être récupérée dans le sang. Une autre possibilité pour améliorer le transport transépithélial est l'administration de modulateurs de la jonction serrée. Récemment, il a été démontré que la MMP-9 IN pourrait être utilisée comme un amplificateur local de la perméabilité nasale (Lochhead *et al.* 2015). La MMP-9 est naturellement exprimée sous forme active dans l'épithélium olfactif (Gueye *et al.* 2011) où elle semble jouer un rôle dans la réépithélialisation et la migration des neurones sensoriels olfactifs issus du renouvellement des cellules basales. Il a déjà été démontré que la MMP-9 est capable d'augmenter transitoirement la perméabilité de la barrière périneurale pour délivrer des médicaments analgésiques, en partie par l'altération de la claudine-1. Cette dernière étant également une protéine des jonctions serrées de l'épithélium nasal humain et olfactif (Wolburg *et al.* 2008; Kamekura *et al.* 2009). En revanche, souvent ces amplificateurs peuvent provoquer une irritation significative de la muqueuse nasale (Martin *et al.* 1997). A ce stade, des études supplémentaires sont nécessaires pour améliorer la distribution des biothérapies par voie nasale et leur biodisponibilité une fois passé la barrière épithéliale. L'utilisation de nanoparticules lipidiques comme véhicule est une piste intéressante mais qui sort du cadre de travail de cette thèse.

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

Cette étude a démontré la preuve de concept que l'administration IN est une voie non invasive qui pourrait être développée comme alternative pour l'administration des FAH dans le traitement de l'HB. Si la sécurité et l'efficacité de la prévention et du traitement des hémorragies sont prouvées, nous sommes convaincus que l'utilisation de l'administration IN peut considérablement améliorer la qualité de vie des patients et des soignants. Des études précliniques supplémentaires sont nécessaires pour :

- i) Réaliser des tests de coagulation *in vivo* avec section de la queue de la souris
- ii) Evaluer l'administration IN à l'aide de rFIX-Alb
- iii) Evaluer l'administration IN dans l'HA
- iv) Optimiser la méthodologie de l'administration IN en modifiant les principaux paramètres : perméabilité membranaire, température, pH, poids moléculaire
- v) Evaluer l'intérêt des nanoparticules lipidiques comme véhicule permettant d'améliorer l'administration IN.

# Synthèse



Les objectifs de cette thèse étaient de tenter de répondre à trois questions relatives aux biothérapies et leur utilisation dans la PNS :

- Comment définir la sévérité de la PNS en prenant en compte l'ensemble des données cliniques, biologiques et radiologiques pour identifier la population cible des biothérapies ?
- Quelle est l'influence *in vitro* des cytokines (IL-6, OSM, IL-4 et IL-13) sur les fonctions épithéliales de barrière, de CMC et de réparation épithéliale ? Quel est l'effet des biothérapies, notamment le dupilumab, sur les fonctions épithéliales altérées par la présence d'un microenvironnement inflammatoire T2 ? A-t-elle un effet direct sur la cellule épithéliale ?
- L'administration par voie nasale de biothérapies est-elle possible ? Doit-elle être fondée sur le développement de volumineuses protéines de fusion associant molécule thérapeutique au Fc des Ig grâce à un mécanisme FcRn dépendant ?

i) L'étude nationale prospective multicentrique *Polyposis Severity Index* (étude PSI) a été mise en place en France (NCT05056714) en septembre 2021. Elle devrait permettre d'établir un score de sévérité composite de la PNS. Ce score inclura l'ensemble des données nécessaires (cliniques, scanographiques et biologiques), toutes pondérées en fonction de leur importance, à l'évaluation de la sévérité de la PNS. Les inclusions avancent à un rythme satisfaisant (10 inclusions/M) avec un objectif cible pour le début des modélisations qui devraient être atteints prochainement (n=470). La fin des inclusions est prévue pour la fin d'année 2023. Un travail préliminaire de modélisation a déjà été conduit, mais l'estimation des coefficients des équations structurelles ne peut encore être réalisée.

ii) Dans la physiopathologie de la PNS, le mécanisme initial de la formation des polypes pourrait être une rupture de la continuité épithéliale et de la membrane basale qui initialiserait ensuite la cascade inflammatoire T1 ou T2. La défaillance de la fonction de barrière, expose l'épithélium à une plus grande stimulation antigénique et donc plus d'inflammation, mais l'inflammation endommage, elle aussi, la barrière épithéliale, favorisant ainsi la chronicité. Le microenvironnement inflammatoire semble jouer un rôle prépondérant dans les dysfonctions épithéliales présentes dans la PNS. A ce titre, des AcM spécifiques de nombreuses cytokines sont disponibles à la prescription (anti IL-5, anti-IL5R, ou anti-IL4R $\alpha$ ). Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'effet direct sur l'ensemble des fonctions épithéliales testées de l'OSM, cytokine de la famille de l'IL-6 dont les effets sur la peau sont très bien décrits mais dont les effets au niveau épithélial nasal n'étaient pas caractérisés. L'OSM a réduit de façon significative la fonction de barrière épithéliale et la CMC, tout en accélérant la vitesse de réparation épithéliale ce qui pourrait conduire à la fibrose et à la formation des polypes. L'IL-6, qui joue un rôle important dans l'asthme, et qui avait fait la preuve d'une accélération significative de la vitesse de fermeture d'une blessure épithéliale *in vitro* sur CENH, n'a montré aucun effet sur la fonction de barrière (RETE et expression des protéines de JS), ni sur la CMC. L'IL-13, non plus, n'a montré aucun effet sur la fonction de barrière, la CMC et la réparation épithéliale. En revanche, ces travaux de thèse suggèrent un rôle majeur de l'OSM, nouvelle cible thérapeutique, et renforce le rôle déjà largement décrit de l'IL-4 dans la physiopathologie de la PNS.

Des éléments clefs pouvant apporter des données mécanistiques sur l'efficacité du dupilumab ont également été observés, ce dernier étant capable de restaurer *in vitro* l'ensemble des fonctions épithéliales altérées par le microenvironnement inflammatoire en particulier l'IL-4. Cela vient renforcer l'idée d'une potentielle optimisation thérapeutique si le dupilumab était administré localement, sans compter l'éventualité d'un passage transmuqueux nasal, dont la preuve de concept pour des protéines de haut poids moléculaire de l'HB a également fait l'objet de cette thèse.

iii) Bien que les avantages de l'administration IN aient été démontrés pour de petites molécules telles que le sumatriptan, l'ocytocine, ou encore l'insuline, le passage transmuqueux de molécules de poids moléculaire plus élevé n'avait pas été évalué par voie nasale. Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que l'administration IN de protéines de haut poids moléculaire était possible, mais surtout passive et FcRn indépendante. Les protéines rFIX et rFIX-Fc ont été identifiées en western blot, avec une bande unique à 55kDa et à 98kDa, respectivement ; confirmant que l'absorption muqueuse de rFIX ou rFIX-Fc n'a pas altéré leur structure, indépendamment de la souche de souris testée, y compris les souris FIX KO, c'est-à-dire les souris HB. L'administration de biothérapies par voie IN fonctionne, la présence du FcRn n'est pas nécessaire, et les molécules thérapeutiques semblent conserver leurs propriétés fonctionnelles. Après avoir prouvé que l'administration nasale était possible, ces travaux ont permis de confirmer le maintien des propriétés thérapeutiques du FIX. En effet, les résultats des analyses protéiques et chromogéniques ont confirmé que la molécule était toujours activable après son passage transmuqueux. Ainsi, nous avons pu confirmer l'hypothèse initiale que l'administration IN était efficace et que les biothérapies conservaient leur intégrité après avoir atteint la circulation systémique. De nombreuses questions persistent, notamment sur le rapport entre la quantité administrée et la concentration plasmatique (en moyenne, la biodisponibilité après administration IN était environ 5 à 6 fois inférieure à celle de l'administration IV), et sur les méthodes d'optimisation de l'administration qui feront l'objet d'autres travaux dans le futur au sein du LBTI où je vais poursuivre mon activité de recherche.

Deux études faisant partie de ce travail de thèse sur les cytokines ont été réalisées. La première étude sur l'IL-6 et l'OSM a fait l'objet d'une communication orale au congrès nationale de la SFORL & CCF lors du congrès annuel à Marseille en octobre 2022, mais aussi au congrès international de l'IFOS à Dubai en janvier 2023 ainsi que d'un article publié dans *IJMS (Oncostatin M Contributes to Airway Epithelial Cell Dysfunction in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. Int J Mol Sci. 23 mars 2023 ;24(7) :6094. ; IF=6, rang B)*. Elle sera également présentée lors du congrès européen de l'ERS à Sofia en juin 2023 où elle a été déposée pour le prix de la recherche délivré par l'ERS et l'ISIAN, la bourse *ERS Research Grant Young Researcher for Work*. La deuxième étude sur l'IL-4 et le dupilumab a été soumise pour publication au *JACI (Dupilumab restores nasal epithelial barrier functions altered by IL-4 in vitro : additional proof for its efficacy ; IF=14, rang A)* et une communication orale a été acceptée pour le congrès européen de l'ERS à Sofia en juin 2023 et également pour le congrès national de la SFORL & CCF en octobre 2023.

Deux études faisant partie de ce travail de thèse sur l'administration non invasive par voie nasale ont été réalisées. La première est une revue systématique de la littérature publiée dans *IJMS (FcRn as a Transporter for Nasal Delivery of Biologics : A Systematic Review. Int J Mol Sci. 17 juin 2021 ;22(12) :6475. ; IF=6, rang B)*. La deuxième portant sur le développement de l'administration nasale de facteur de la coagulation dans l'hémophilie m'a permis d'être lauréat de la bourse de la SFORL & CCF en 2020, me permettant ainsi de réaliser une année dédiée à la recherche à temps complet. Les résultats de cette étude ont été soumis pour publication au *JTH (In vivo intranasal delivery of coagulation factor IX : a proof-of-concept study, Fieux M et al. ; IF=16, rang A)* et une communication orale a été acceptée pour le congrès européen de l'ERS à Sofia en juin 2023 et également au congrès national de la SFORL & CCF en octobre 2023.

# Conclusion et perspectives



En conclusion, nous avons pu voir, à travers la littérature et mes travaux, l'implication majeure des cytokines et de la cellule épithéliale dans la physiopathologie de la PNS. Les biothérapies ayant l'AMM et en cours de développement ciblent, avant tout, les interleukines de l'inflammation T2 et les EO, mais de nouvelles cytokines ont été mises en évidence et le rôle de la cellule épithéliale confirmé par les travaux présentés dans cette thèse. L'épithélium nasal ne doit pas être négligé, à la fois comme cible thérapeutique, mais aussi comme barrière, pouvant favoriser le transport de biothérapies par voie nasale. L'OSM devient une nouvelle cible thérapeutique. L'IL-4 est renforcée dans son rôle majeur avec un impact sur l'ensemble des fonctions épithéliales testées dans ce travail. Le dupilumab restaure l'ensemble des fonctions épithéliales de façon spécifique et n'entraîne aucune altération des fonctions épithéliales. Ces résultats sont une preuve additionnelle de son efficacité déjà largement décrite *in vivo* chez l'homme dans des ECR. Enfin, nous avons fait la preuve de concept, dans un modèle animal murin, que l'administration IN fonctionnait pour les FAH dans le traitement de l'HB.

Ces travaux laissent envisager des développements futurs dans la PNS mais aussi dans l'HB :

i) Concernant la physiopathologie de la PNS et son traitement, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste un enjeu majeur. De nombreuses biothérapies existent dans les maladies T2, deux sont disponibles pour la prescription dans la PNS, d'autres sont à l'étude et la collecte de données doit être poursuivie pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, mais aussi identifier les patients répondeurs et trouver les facteurs prédictifs de réponse à ces traitements innovants mais dont le coût est très élevé. Un projet du Dr. Carsuzaa Florent déposé dans la région grand Ouest a été retenu pour permettre un *screening* large du spectre cytokinique chez les patients opérés pour une polyposse nasosinusienne. Ce projet qui inclura plusieurs centres dont Créteil et Lyon, impliquera les ORL mais aussi les anatomopathologistes. Nous collaborons déjà avec le Dr. Carsuzaa dans le cadre de nos travaux sur les cytokines et l'épithélium, et c'est donc logiquement que nous allons continuer de collaborer au sein de cet ambitieux projet Predicto Polype. En plus des prélèvements directement congelés dans l'azote, l'anatomopathologiste travaillant au sein de mon CHU de rattachement, le Dr. Benzerdjeb Nazim participera à l'interprétation des lames pour faire le lien entre clinique, histologie et biologie cellulaire.

ii) Concernant l'effet direct des cytokines sur l'épithélium, parmi les alarmines décrites dans ce travail, la TSLP, dont l'AcM correspondant est le tézépélumab semble très prometteur. En effet, situé tout en haut de la cascade inflammatoire, dès l'agression épithéliale à l'origine de la dysrégulation qui conduira à l'inflammation chronique et à la formation des polypes, son antagonisation pourrait avoir un effet thérapeutique révolutionnaire. Déjà validé par la FDA dans l'asthme, les rhinologistes sont dans l'attente de son arrivée sur le marché européen puis français dans la PNS. C'est pourquoi, lorsque Yvan Bellanger, interne d'ORL, a rencontré l'équipe de M. Bruno Louis, du Pr. André Coste et du Dr. Emilie Béquignon à l'IMRB pour la réalisation d'un master 2, j'ai eu l'opportunité d'encadrer un étudiant sur un projet faisant suite à mes travaux de Thèse d'Université pour lequel je maîtrisais les méthodes nécessaires. Après l'avoir guidé dans ses demandes de bourses, il a obtenu celle du CFORL & CCF. Je l'encadre dans son travail de recherche depuis le mois de janvier 2023. Ses travaux sur la TSLP et l'épithélium feront l'objet d'une autre publication dans une revue indexée.

iii) Enfin, un projet de recherche multidisciplinaire sur les biothérapies de l'hémophilie en partenariat avec le LBTI à Lyon est déjà en cours, il s'agit du projet de maturation du CRNS confidentiel qui fait suite à un dépôt de brevet. D'autres travaux seront menés en prenant l'exemple de rFIX-Alb, en élargissant à l'hémophilie A et à d'autres voies locales non invasives. De plus, un projet commun avec Mme Claire Monge a été déposé à la Fondation pour la Recherche Médicale pour optimiser l'administration IN de biothérapies de la PNS à l'aide de nanoparticules lipidiques. Ces dernières font la spécificité de son équipe que je dois rejoindre à l'issue de ces travaux de thèse.



# Bibliographie



- Aazami, H., Farhad Seif, Babak Ghalehbaghi, *et al.* 2018. « Levels of Total IgA and IgA Subclasses in the Serum of Chronic Rhinosinusitis Patients ». *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* 32: 94. <https://doi.org/10.14196/mjiri.32.94>.
- Abbas, A. K., K. M. Murphy, et A. Sher. 1996. « Functional Diversity of Helper T Lymphocytes ». *Nature* 383 (6603): 787-93. <https://doi.org/10.1038/383787a0>.
- Abbas, A. K. 2020. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Sixth edition. Philadelphia, PA: Elsevier.
- Abdelilah, S., K. Latifa, N. Esra, *et al.* 2001. « Functional Expression of IL-9 Receptor by Human Neutrophils from Asthmatic Donors: Role in IL-8 Release ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (4): 2768-74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2768>.
- Agache, I., C. Akdis, M. Jutel, et J. C. Virchow. 2012. « Untangling Asthma Phenotypes and Endotypes ». *Allergy* 67 (7): 835-46. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2012.02832.x>.
- Ahdieh, M., T. Vandenbos, et A. Youakim. 2001. « Lung Epithelial Barrier Function and Wound Healing Are Decreased by IL-4 and IL-13 and Enhanced by IFN-Gamma ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 281 (6): C2029-2038. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.6.C2029>.
- Akdis, C. A., Claus Bachert, Cemal Cingi, *et al.* 2013. « Endotypes and Phenotypes of Chronic Rhinosinusitis: A PRACTALL Document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (6): 1479-90. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.036>.
- Aledort, L. M. 2001. « Making a Therapeutic Choice: Human versus Recombinant Fractions - Can We Do It? » *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 7 Suppl 1 (janvier): 1-3. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2001.00095.x>.
- Aledort, L. M., et D. M. Dimichele. 1998. « Inhibitors Occur More Frequently in African-American and Latino Haemophiliacs ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 4 (1): 68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.1998.0146c.x>.
- An, Xingyue, Melisa Martinez-Paniagua, Ali Rezvan, *et al.* 2021. « Single-Dose Intranasal Vaccination Elicits Systemic and Mucosal Immunity against SARS-CoV-2 ». *IScience*, août, 103037. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103037>.
- Andersen, J. T., Bjørn Dalhus, Dorthe Viuff, *et al.* 2014. « Extending Serum Half-Life of Albumin by Engineering Neonatal Fc Receptor (FcRn) Binding ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (19): 13492-502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.549832>.
- Andersen, J. T., Julie Dee Qian, et Inger Sandlie. 2006. « The Conserved Histidine 166 Residue of the Human Neonatal Fc Receptor Heavy Chain Is Critical for the PH-Dependent Binding to Albumin ». *European Journal of Immunology* 36 (11): 3044-51. <https://doi.org/10.1002/eji.200636556>.
- Anderson, Gary P. 2008. « Endotyping Asthma: New Insights into Key Pathogenic Mechanisms in a Complex, Heterogeneous Disease ». *Lancet (London, England)* 372 (9643): 1107-19. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61452-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61452-X).
- Angkasekwinai, P., Seon Hee Chang, Manoj Thapa, *et al.* 2010. « Regulation of IL-9 Expression by IL-25 Signaling ». *Nature Immunology* 11 (3): 250-56. <https://doi.org/10.1038/ni.1846>.
- Arya, S., Fartoon M. Siad, Pamela Wilton, *et al.* 2022. « Invisible Bleeds: Lived Experiences and Barriers to Care for Men with Hemophilia ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 20 (2): 296-306. <https://doi.org/10.1111/jth.15570>.
- Asano, T., Yoshihiro Kanemitsu, Masaya Takemura, *et al.* 2017. « Serum Periostin as a Biomarker for Comorbid Chronic Rhinosinusitis in Patients with Asthma ». *Annals of the American Thoracic Society* 14 (5): 667-75. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201609-720OC>.
- Avery, L. B., Mengmeng Wang, Mania S. Kavosi, *et al.* 2016. « Utility of a Human FcRn Transgenic Mouse Model in Drug Discovery for Early Assessment and Prediction of Human Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies ». *MAbs* 8 (6): 1064-78. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1193660>.
- Baba, S., K. Kondo, M. Toma-Hirano, *et al.* 2014. « Local Increase in IgE and Class Switch Recombination to IgE in Nasal Polyps in Chronic Rhinosinusitis ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44 (5): 701-12. <https://doi.org/10.1111/cea.12287>.
- Baba, S., K. Kondo, Maho Suzukawa, *et al.* 2017. « Distribution, Subtype Population, and IgE Positivity of Mast Cells in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 119 (2): 120-28. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.05.019>.
- Babbin, B. A., Charles A. Parkos, Kenneth J. Mandell, *et al.* 2007. « Annexin 2 Regulates Intestinal Epithelial Cell Spreading and Wound Closure through Rho-Related Signaling ». *The American Journal of Pathology* 170 (3): 951-66. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060647>.
- Bachert, C., M. Wagenmann, U. Hauser, et C. Rudack. 1997. « IL-5 Synthesis Is Upregulated in Human Nasal Polyp Tissue ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99 (6 Pt 1): 837-42.

[https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(97\)80019-x](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)80019-x).

Bachert, C., M. Wagenmann, C. Rudack, *et al.* 1998. « The Role of Cytokines in Infectious Sinusitis and Nasal Polyposis ». *Allergy* 53 (1): 2-13. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb03767.x>.

Bachert, C., Joseph K. H., Martin Desrosiers, *et al.* 2019a. « 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 (London, England)* 394 (10209):1638-50. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31881-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31881-1).

Bachert, C., Joseph K. H., Martin Desrosiers, *et al.* 2019b. « 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 (London, England)* 394 (10209):1638-50. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31881-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31881-1).

Bachert, C., Joseph K. Han, Martin Y. Desrosiers, *et al.* 2022. « Efficacy and Safety of Benralizumab in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: A Randomized, Placebo-Controlled Trial ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 149 (4): 1309-1317.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.08.030>.

Bachert, C., Peter W. Hellings, Joaquim Mullol, *et al.* 2020. « Dupilumab Improves Health-Related Quality of Life in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis ». *Allergy* 75 (1): 148-57. <https://doi.org/10.1111/all.13984>.

Bachert, C., Leda Mannent, Robert M. Naclerio, *et al.* 2016. « Effect of Subcutaneous Dupilumab on Nasal Polyp Burden in Patients With Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis: A Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 315 (5): 469-79. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.19330>.

Bachert, C., Ana R. Sousa, Valerie J. Lund, *et al.* 2017. « Reduced Need for Surgery in Severe Nasal Polyposis with Mepolizumab: Randomized Trial ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (4): 1024-1031.e14. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.044>.

Bachert, C., Luo Zhang, et Phillippe Gevaert. 2015. « Current and Future Treatment Options for Adult Chronic Rhinosinusitis: Focus on Nasal Polyposis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136 (6): 1431-40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.010>.

Bachert, C., Nan Zhang, Peter W. Hellings, et Jean Bousquet. 2018. « Endotype-Driven Care Pathways in Patients with Chronic Rhinosinusitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (5): 1543-51. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.03.004>.

Balafas, E. G., Paraskevi I. Papakyriakopoulou, Nikolaos G. Kostomitsopoulos, et Georgia N. Valsami. 2023. « Intranasal Administration of a Polymeric Biodegradable Film to C57BL/6 Mice ». *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 62 (2): 179-84. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-22-000091>.

Ballantyne, S. J., Jillian L. Barlow, Helen E. Jolin, *et al.* 2007. « Blocking IL-25 Prevents Airway Hyperresponsiveness in Allergic Asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (6): 1324-31. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.051>.

Banday, M. M., Sangeetha B. Rao, Shruthi Shankar, *et al.* 2023. « IL-33 Mediates Pseudomonas Induced Airway Fibrogenesis and Is Associated with CLAD ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation* 42 (1): 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2022.09.018>.

Banks, C. A., Rodney J. Schlosser, Eric W. Wang, *et al.* 2014. « Macrophage Infiltrate Is Elevated in CRSwNP Sinonasal Tissue Regardless of Atopic Status ». *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 151 (2): 215-20. <https://doi.org/10.1177/0194599814528672>.

Barnay-Verdier, S., Vincent Maréchal, et Chloé Borde. 2009. « HMGB1: un lien entre inflammation septique et non septique ». *Revue Francophone Des Laboratoires* 2009 (417): 59-68. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(09\)70310-7](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(09)70310-7).

Bartier, S., A. Coste, et E. Béquignon. 2020. « Biotherapy and Treatment of Adult Primary Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Cellular and Molecular Bases ». *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, décembre. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2020.12.002>.

Batzakakis, D., Theodoros Stathas, Nikos Mastronikolis, *et al.* 2014. « Adhesion Molecules as Predictors of Nasal Polyposis Recurrence ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 28 (1): 20-22. <https://doi.org/10.2500/ajra.2014.28.3962>.

Bell, B. D., Masayuki Kitajima, Ryan P. Larson, *et al.* 2013. « The Transcription Factor STAT5 Is Critical in Dendritic Cells for the Development of TH2 but Not TH1 Responses ». *Nature Immunology* 14 (4): 364-71. <https://doi.org/10.1038/ni.2541>.

Belliveau, P. P. 2005. « Omalizumab: A Monoclonal Anti-IgE Antibody ». *MedGenMed: Medscape General Medicine* 7 (1): 27.

Benedict, C., William H. Frey, Helgi B. Schiöth, *et al.* 2011. « Intranasal Insulin as a Therapeutic Option in the Treatment of Cognitive Impairments ». *Experimental Gerontology* 46 (2-3): 112-15.

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.026>.

Benedict, C., Manfred Hallschmid, Astrid Hatke, *et al.* 2004. « Intranasal Insulin Improves Memory in Humans ». *Psychoneuroendocrinology* 29 (10): 1326-34. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2004.04.003>.

Benedict, C., Manfred Hallschmid, Katrin Schmitz, *et al.* 2007. « Intranasal Insulin Improves Memory in Humans: Superiority of Insulin Aspart ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32 (1): 239-43. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301193>.

Bentler, P. M. 1995. *EQS structural equations program manual*. Vol. 6. Multivariate software Encino, CA.

Bequignon, E., Christine Dhommée, Christelle Angely, *et al.* 2019. « FcRn-Dependent Transcytosis of Monoclonal Antibody in Human Nasal Epithelial Cells *In vitro*: A Prerequisite for a New Delivery Route for Therapy? » *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061379>.

Bequignon, E., David Mangin, Justine Bécaud, *et al.* 2020. « Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Role of IL-6 in Airway Epithelial Cell Dysfunction ». *Journal of Translational Medicine* 18 (1): 136. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02309-9>.

Berger, G., Avi Kattan, Joelle Bernheim, et Dov Ophir. 2002. « Polypoid Mucosa with Eosinophilia and Glandular Hyperplasia in Chronic Sinusitis: A Histopathological and Immunohistochemical Study ». *The Laryngoscope* 112 (4): 738-45. <https://doi.org/10.1097/00005537-200204000-00026>.

Beriou, G., Elizabeth M. Bradshaw, Ester Lozano, *et al.* 2010. « TGF-Beta Induces IL-9 Production from Human Th17 Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (1): 46-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000356>.

Bern, M., Jeannette Nilsen, Mattia Ferrarese, *et al.* 2020. « An Engineered Human Albumin Enhances Half-Life and Transmucosal Delivery When Fused to Protein-Based Biologics ». *Science Translational Medicine* 12 (565). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb0580>.

Bernstein, J. M., et J. R. Yankaskas. 1994. « Increased Ion Transport in Cultured Nasal Polyp Epithelial Cells ». *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 120 (9): 993-96. <https://doi.org/10.1001/archotol.1994.01880330071013>.

Bidder, T., J. Sahota, C. Rennie, *et al.* 2018. « Omalizumab Treats Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma Together-a Real Life Study ». *Rhinology* 56 (1): 42-45. <https://doi.org/10.4193/Rhin17.139>.

Bitonti, A. J., et Jennifer A. Dumont. 2006. « Pulmonary Administration of Therapeutic Proteins Using an Immunoglobulin Transport Pathway ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (9-10): 1106-18. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.015>.

Bitonti, A. J., Jennifer A. Dumont, Susan C. Low, *et al.* 2004. « Pulmonary Delivery of an Erythropoietin Fc Fusion Protein in Non-Human Primates through an Immunoglobulin Transport Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26): 9763-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403235101>.

Bitsaktsis, C., Zulfia Babadjanova, et Edmund J. Gosselin. 2015. « *In vivo* Mechanisms Involved in Enhanced Protection Utilizing an Fc Receptor-Targeted Mucosal Vaccine Platform in a Bacterial Vaccine and Challenge Model ». *Infection and Immunity* 83 (1): 77-89. <https://doi.org/10.1128/IAI.02289-14>.

Bjerner, L., Catherine Lemiere, Jorge Maspero, *et al.* 2016. « Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma With Elevated Blood Eosinophil Levels: A Randomized Phase 3 Study ». *Chest* 150 (4): 789-98. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.03.032>.

Bleecker, E. R., J. Mark FitzGerald, Pascal Chanez, *et al.* 2016. « Efficacy and Safety of Benralizumab for Patients with Severe Asthma Uncontrolled with High-Dosage Inhaled Corticosteroids and Long-Acting B2-Agonists (SIROCCO): A Randomised, Multicentre, Placebo-Controlled Phase 3 Trial ». *Lancet (London, England)* 388 (10056): 2115-27. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31324-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31324-1).

Boekhorst, J., G. R. Lari, R. D'Oiron, *et al.* 2008. « Factor VIII Genotype and Inhibitor Development in Patients with Haemophilia A: Highest Risk in Patients with Splice Site Mutations ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 14 (4): 729-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01694.x>.

Boland, S., A. Baeza-Squiban, T. Fournier, *et al.* 1999. « Diesel Exhaust Particles Are Taken up by Human Airway Epithelial Cells *in vitro* and Alter Cytokine Production ». *The American Journal of Physiology* 276 (4): L604-613. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.4.L604>.

Bolton-Maggs, Paula H. B., et K. John Pasi. 2003. « Haemophilias A and B ». *Lancet (London, England)* 361 (9371): 1801-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13405-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13405-8).

Bond, M., M. Jankowski, H. Patel, *et al.* 1998. « Biochemical Characterization of Recombinant Factor IX ». *Seminars in Hematology* 35 (2 Suppl 2): 11-17.

Bonfils, P., P. Halimi, A.-L. Gaultier, et Q. Lisan. 2016. « Polyposse nasosinusienne. Rhinosinusite chronique avec polypes ». *Encyclopédie médico-chirurgicale* 20-435-A-10 (décembre). [https://doi.org/10.1016/S0246-0351\(16\)76892-9](https://doi.org/10.1016/S0246-0351(16)76892-9).

Boniface, K., Caroline Diveu, Franck Morel, *et al.* 2007. « Oncostatin M Secreted by Skin Infiltrating T Lymphocytes Is a Potent Keratinocyte Activator Involved in Skin Inflammation ». *Journal of Immunology*

(*Baltimore, Md.: 1950*) 178 (7): 4615-22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4615>.

Bonneau, D., F. Raymond, C. Kremer, *et al.* 1993. « Usher Syndrome Type I Associated with Bronchiectasis and Immobile Nasal Cilia in Two Brothers ». *Journal of Medical Genetics* 30 (3): 253-54. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.3.253>.

Bonser, Luke R., Lorna Zlock, *et al.* 2016. « Epithelial Tethering of MUC5AC-Rich Mucus Impairs Mucociliary Transport in Asthma ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (6): 2367-71. <https://doi.org/10.1172/JCI84910>.

Borish, Larry. 2019. « Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease: A Syndrome of Mast Cell-Mediated PgD2 Overproduction ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 200 (6): 651-52. <https://doi.org/10.1164/rccm.201904-0716ED>.

Botelho, F., Anisha Dubey, Ehab A. Ayaub, *et al.* 2020. « IL-33 Mediates Lung Inflammation by the IL-6-Type Cytokine Oncostatin M ». *Mediators of Inflammation* 2020: 4087315. <https://doi.org/10.1155/2020/4087315>.

Botelho, F. M., Javier Rangel-Moreno, Dominik Fritz, *et al.* 2013. « Pulmonary Expression of Oncostatin M (OSM) Promotes Inducible BALT Formation Independently of IL-6, despite a Role for IL-6 in OSM-Driven Pulmonary Inflammation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (3): 1453-64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203318>.

Botterel, F., C. Cordonnier, V. Barbier, *et al.* 2002. « Aspergillus Fumigatus Causes *in vitro* Electrophysiological and Morphological Modifications in Human Nasal Epithelial Cells ». *Histology and Histopathology* 17 (4): 1095-1101. <https://doi.org/10.14670/HH-17.1095>.

Botterel, F., Karine Gross, Oumaïma Ibrahim-Granet, *et al.* 2008. « Phagocytosis of Aspergillus Fumigatus Conidia by Primary Nasal Epithelial Cells *in vitro* ». *BMC Microbiology* 8 (juin): 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-97>.

Bottier, M., Sylvain Blanchon, Gabriel Pelle, *et al.* 2017. « A New Index for Characterizing Micro-Bead Motion in a Flow Induced by Ciliary Beating: Part I, Experimental Analysis ». *PLoS Computational Biology* 13 (7): e1005605. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005605>.

Bottier, M., Marta Peña Fernández, Gabriel Pelle, *et al.* 2017. « A New Index for Characterizing Micro-Bead Motion in a Flow Induced by Ciliary Beating: Part II, Modeling ». *PLoS Computational Biology* 13 (7): e1005552. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005552>.

Boulet, L. P., K. R. Chapman, J. Côté, *et al.* 1997. « Inhibitory Effects of an Anti-IgE Antibody E25 on Allergen-Induced Early Asthmatic Response ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (6): 1835-40. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.6.9196083>.

Bousquet, J., T. J. H. Clark, S. Hurd, *et al.* 2007. « GINA Guidelines on Asthma and Beyond ». *Allergy* 62 (2): 102-12. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01305.x>.

Bowyer, A. E., A. Hillarp, M. Ezban, P. Persson, et S. Kitchen. 2016. « Measuring Factor IX Activity of Nonacog Beta Pegol with Commercially Available One-Stage Clotting and Chromogenic Assay Kits: A Two-Center Study ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 14 (7): 1428-35. <https://doi.org/10.1111/jth.13348>.

Brambilla, Michela, Rosa Manenti, Giovanni de Girolamo, *et al.* 2016. « Effects of Intranasal Oxytocin on Long-Term Memory in Healthy Humans: A Systematic Review ». *Drug Development Research* 77 (8): 479-88. <https://doi.org/10.1002/ddr.21343>.

Braverman, I., E. D. Wright, C. G. Wang, *et al.* 1998. « Human Nasal Ciliary-Beat Frequency in Normal and Chronic Sinusitis Subjects ». *The Journal of Otolaryngology* 27 (3): 145-52.

Brescia, Giuseppe, Umberto Barion, Claudia Zanotti, *et al.* 2017. « The Prognostic Role of Serum Eosinophil and Basophil Levels in Sinonasal Polyposis ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 7 (3): 261-67. <https://doi.org/10.1002/alr.21885>.

Brusselle, Guy G., Tania Maes, et Ken R. Bracke. 2013. « Eosinophils in the Spotlight: Eosinophilic Airway Inflammation in Nonallergic Asthma ». *Nature Medicine* 19 (8): 977-79. <https://doi.org/10.1038/nm.3300>.

Buisson, A. C., C. Gilles, M. Polette, *et al.* 1996. « Wound Repair-Induced Expression of a Stromelysins Is Associated with the Acquisition of a Mesenchymal Phenotype in Human Respiratory Epithelial Cells ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 74 (3): 658-69.

Buisson, A. C., J. M. Zahm, M. Polette, *et al.* 1996. « Gelatinase B Is Involved in the *in vitro* Wound Repair of Human Respiratory Epithelium ». *Journal of Cellular Physiology* 166 (2): 413-26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199602\)166:2<413::AID-JCP20>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199602)166:2<413::AID-JCP20>3.0.CO;2-A).

Bumsted, R. M., T. El-Ackad, J. M. Smith, et M. J. Brody. 1979. « Histamine, Norepinephrine and Serotonin Content of Nasal Polyps ». *The Laryngoscope* 89 (5 Pt 1): 832-43. <https://doi.org/10.1288/00005537-197905000-00023>.

Burmeister, W. P., A. H. Huber, et P. J. Bjorkman. 1994. « Crystal Structure of the Complex of Rat Neonatal Fc Receptor with Fc ». *Nature* 372 (6504): 379-83. <https://doi.org/10.1038/372379a0>.

Burnouf, T., et M. Radosevich. 2003. « Nanofiltration of Plasma-Derived Biopharmaceutical Products ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 9 (1): 24-37.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00701.x>.

Cahill, K. N., et Tanya M. Laidlaw. 2016. « Pathogenesis of Aspirin-Induced Reactions in Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease ». *Immunology and Allergy Clinics of North America* 36 (4): 681-91. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2016.06.005>.

Cao, P.-P., Y.-N. Zhang, B. Liao, *et al.* 2014. « Increased Local IgE Production Induced by Common Aeroallergens and Phenotypic Alteration of Mast Cells in Chinese Eosinophilic, but Not Non-Eosinophilic, Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44 (5): 690-700. <https://doi.org/10.1111/cea.12304>.

Cardet, J. C., et Elliot Israel. 2015. « Update on Reslizumab for Eosinophilic Asthma ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 15 (10): 1531-39. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1090972>.

Carsuzaa, F., Émilie Béquignon, Matthieu Binaud, *et al.* 2022. « Oncostatin M Counteracts the Fibrotic Effects of TGF- $\beta$ 1 and IL-4 on Nasal-Polyp-Derived Fibroblasts: A Control of Fibrosis in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps? » *International Journal of Molecular Sciences* 23 (11): 6308. <https://doi.org/10.3390/ijms23116308>.

Carsuzaa, F., Emilie Bequignon, Sophie Bartier, *et al.* 2023. « Oncostatin M Contributes to Airway Epithelial Cell Dysfunction in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (7): 6094. <https://doi.org/10.3390/ijms24076094>.

Carsuzaa, F., Émilie Béquignon, Xavier Dufour, *et al.* 2021. « Cytokine Signature and Involvement in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (1): 417. <https://doi.org/10.3390/ijms23010417>.

Carter, Paul J., et Greg A. Lazar. 2018. « Next Generation Antibody Drugs: Pursuit of the “High-Hanging Fruit” ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 17 (3): 197-223. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.227>.

Casale, T. B., I. L. Bernstein, W. W. Busse, *et al.* 1997. « Use of an Anti-IgE Humanized Monoclonal Antibody in Ragweed-Induced Allergic Rhinitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100 (1): 110-21. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(97\)70202-1](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)70202-1).

Castro, Mario, James Zangrilli, Michael E. Wechsler, *et al.* 2015. « Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma with Elevated Blood Eosinophil Counts: Results from Two Multicentre, Parallel, Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trials ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 3 (5): 355-66. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00042-9).

Cayé-Thomasen, P., A. Hermansson, M. Tos, et K. Prellner. 1995. « Polyp Pathogenesis--a Histopathological Study in Experimental Otitis Media ». *Acta Oto-Laryngologica* 115 (1): 76-82. <https://doi.org/10.3109/00016489509133351>.

Cerutti, Andrea, Kang Chen, et Alejo Chorny. 2011. « Immunoglobulin Responses at the Mucosal Interface ». *Annual Review of Immunology* 29: 273-93. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101317>.

Chackerian, A. A., Elizabeth R Oldham, Erin E Murphy, *et al.* 2007. « IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex ». *The Journal of Immunology* 179 (4): 2551-55.

Challa, Dilip K., Ramraj Velmurugan, Raimund J. Ober, et E. Sally Ward. 2014. « FcRn: From Molecular Interactions to Regulation of IgG Pharmacokinetics and Functions ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 382: 249-72. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0_12).

Chapelin, C., A. Coste, L. Gilain, *et al.* 1996. « Modified Epithelial Cell Distribution in Chronic Airways Inflammation ». *The European Respiratory Journal* 9(12):2474-78. <https://doi.org/10.1183/09031936.96.09122474>.

Chaudhury, C., Samina Mehnaz, John M. Robinson, *et al.* 2003. « The Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan ». *The Journal of Experimental Medicine* 197 (3): 315-22. <https://doi.org/10.1084/jem.20021829>.

Chen, B., Jeffrey Shaari, Steven Eau Claire, *et al.* 2006. « Altered Sinonasal Ciliary Dynamics in Chronic Rhinosinusitis ». *American Journal of Rhinology* 20 (3): 325-29. <https://doi.org/10.2500/ajr.2006.20.2870>.

Chen, Jiun-Bo, Louisa K. James, Anna M. Davies, *et al.* 2017. « Antibodies and Superantibodies in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (4): 1195-1204.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.066>.

Chia, Jenny, Jade Louber, Isabelle Glauser, *et al.* 2018. « Half-Life-Extended Recombinant Coagulation Factor IX-Albumin Fusion Protein Is Recycled via the FcRn-Mediated Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (17): 6363-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817064>.

Chilvers, M. A., et 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): 314-17. <https://doi.org/10.1136/thorax.55.4.314>.

Chilvers, M. A., Andrew Rutman, et Christopher O’Callaghan. 2003. « Ciliary Beat Pattern Is Associated with Specific Ultrastructural Defects in Primary Ciliary Dyskinesia ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112 (3): 518-24. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(03\)01799-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(03)01799-8).

Cho, Kyu-Sup, Chang-Su Kim, Hyun-Sun Lee, *et al.* 2010. « Role of Interferon- $\gamma$ -Producing t Cells in

the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps Associated with Staphylococcal Superantigen ». *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery = Le Journal D'oto-Rhino-Laryngologie Et De Chirurgie Cervico-Faciale* 39 (5): 600-605.

Cho, Seong H., Dae Woo Kim, Sun H. Lee, *et al.* 2015. « Age-Related Increased Prevalence of Asthma and Nasal Polyps in Chronic Rhinosinusitis and Its Association with Altered IL-6 Trans-Signaling ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 53 (5): 601-6. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0207RC>.

Cho, S. H., Dae Woo Kim, et Philippe Gevaert. 2016. « Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice* 4 (4): 575-82. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2016.04.015>.

Chowdhury, N. I., Rakesh K. Chandra, Ping Li, *et al.* 2019. « Investigating the Correlation between Mucus Cytokine Levels, Inflammatory Cell Counts, and Baseline Quality-of-Life Measures in Chronic Rhinosinusitis ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 9 (5): 538-44. <https://doi.org/10.1002/alar.22287>.

Choy, E. H., Marina Bendit, Dana McAleer, *et al.* 2013. « Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of an Anti- Oncostatin M Monoclonal Antibody in Rheumatoid Arthritis: Results from Phase II Randomized, Placebo-Controlled Trials ». *Arthritis Research & Therapy* 15 (5): R132. <https://doi.org/10.1186/ar4312>.

Chung, K. F. 2015. « Targeting the Interleukin Pathway in the Treatment of Asthma ». *Lancet (London, England)* 386 (9998): 1086-96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00157-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00157-9).

Chung, S., Jurriaan M. Peters, Kamil Detyniecki, *et al.* 2023. « The Nose Has It: Opportunities and Challenges for Intranasal Drug Administration for Neurologic Conditions Including Seizure Clusters ». *Epilepsy & Behavior Reports* 21: 100581. <https://doi.org/10.1016/j.ebr.2022.100581>.

Cianga, C., Petru Cianga, Petru Plamadeala, et Cornelia Amalinei. 2011. « Nonclassical Major Histocompatibility Complex I-like Fc Neonatal Receptor (FcRn) Expression in Neonatal Human Tissues ». *Human Immunology* 72 (12): 1176-87. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.08.020>.

Ciprandi, G., Daniela Fenoglio, Mara De Amici, *et al.* 2008. « Serum IL-17 Levels in Patients with Allergic Rhinitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122 (3): 650-651.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.06.005>.

Claypool, S. M., Bonny L. Dickinson, Jessica S. Wagner, *et al.* 2004. « Bidirectional Transepithelial IgG Transport by a Strongly Polarized Basolateral Membrane Fcγ-1 Receptor ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (4): 1746-59. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0832>.

Coates, Allan L. 2008. « Guiding Aerosol Deposition in the Lung ». *The New England Journal of Medicine* 358 (3): 304-5. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0707489>.

Commins, Scott P., Larry Borish, et John W. Steinke. 2010. « Immunologic Messenger Molecules: Cytokines, Interferons, and Chemokines ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2): S53-72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>.

Cook, Daniel P., Christopher M. Thomas, Ashley Y. Wu, *et al.* 2023. « Cystic Fibrosis Reprograms Airway Epithelial IL-33 Release and Licenses IL-33 Dependent Inflammation ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, mars. <https://doi.org/10.1164/rccm.202211-2096OC>.

Corper, A. L., M. K. Sohi, V. R. Bonagura, *et al.* 1997. « Structure of Human IgM Rheumatoid Factor Fab Bound to Its Autoantigen IgG Fc Reveals a Novel Topology of Antibody-Antigen Interaction ». *Nature Structural Biology* 4 (5): 374-81. <https://doi.org/10.1038/nsb0597-374>.

Corren, J., Steven Weinstein, Lindsay Janka, *et al.* 2016. « Phase 3 Study of Reslizumab in Patients With Poorly Controlled Asthma: Effects Across a Broad Range of Eosinophil Counts ». *Chest* 150 (4): 799-810. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.03.018>.

Cosmi, Lorenzo, Francesco Liotta, Roberta Angeli, *et al.* 2004. « Th2 Cells Are Less Susceptible than Th1 Cells to the Suppressive Activity of CD25+ Regulatory Thymocytes Because of Their Responsiveness to Different Cytokines ». *Blood* 103 (8): 3117-21. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3302>.

Coste, A., L. Brugel, B. Maître, *et al.* 2000. « Inflammatory Cells as Well as Epithelial Cells in Nasal Polyps Express Vascular Endothelial Growth Factor ». *The European Respiratory Journal* 15 (2): 367-72. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.15b24.x>.

Coste, A., J. G. Rateau, J. F. Bernaudin, *et al.* 1996. « Nasal Polyposis Pathogenesis: A Flow Cytometric and Immunohistochemical Study of Epithelial Cell Proliferation ». *Acta Oto-Laryngologica* 116 (5): 755-61. <https://doi.org/10.3109/00016489609137920>.

Coste, A., J. G. Rateau, F. Roudot-Thoraval, *et al.* 1996. « Increased Epithelial Cell Proliferation in Nasal Polyps ». *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 122 (4): 432-36. <https://doi.org/10.1001/archotol.1996.01890160072013>.

Coste, A., Q. P. Wang, F. Roudot-Thoraval, *et al.* 1996. « Epithelial Cell Proliferation in Nasal Polyps Could Be Up-Regulated by Platelet-Derived Growth Factor ». *The Laryngoscope* 106 (5 Pt 1): 578-83. <https://doi.org/10.1097/00005537-199605000-00011>.

Couto, L. G. F., Atilio Maximino Fernandes, Daniel Ferracioli Brandão, *et al.* 2008. « Histological Aspects

of Rhinosinusal Polyps ». *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 74 (2): 207-12. [https://doi.org/10.1016/s1808-8694\(15\)31090-9](https://doi.org/10.1016/s1808-8694(15)31090-9).

Craske, J., N. Dilling, et D. Stern. 1975. « An Outbreak of Hepatitis Associated with Intravenous Injection of Factor-VIII Concentrate ». *Lancet (London, England)* 2 (7927): 221-23. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)90688-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)90688-1).

Cushen, B., et Andrew Menzies-Gow. 2020. « Benralizumab: An Updated Treatment of Eosinophilic Asthma ». *Expert Review of Respiratory Medicine* 14 (5): 435-44. <https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1739526>.

Cutting, G. R. 2005. « Modifier Genetics: Cystic Fibrosis ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6: 237-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162254>.

Dabbagh, K., K. Takeyama, H. M. Lee, et al. 1999. « IL-4 Induces Mucin Gene Expression and Goblet Cell Metaplasia *in vitro* and *in vivo* ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (10): 6233-37.

Danielsen, A., Turid Tynning, Karl A. Brokstad, et al. 2006. « Interleukin 5, IL6, IL12, IFN-Gamma, RANTES and Fractalkine in Human Nasal Polyps, Turbinate Mucosa and Serum ». *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 263 (3): 282-89. <https://doi.org/10.1007/s00405-005-1031-1>.

Dardalhon, V., Amit Awasthi, Hyoung Kwon, et al. 2008. « IL-4 Inhibits TGF-Beta-Induced Foxp3+ T Cells and, Together with TGF-Beta, Generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) Effector T Cells ». *Nature Immunology* 9 (12): 1347-55. <https://doi.org/10.1038/ni.1677>.

Davis, C. William, et Eduardo Lazarowski. 2008. « Coupling of Airway Ciliary Activity and Mucin Secretion to Mechanical Stresses by Purinergic Signaling ». *Respiratory Physiology & Neurobiology* 163 (1-3): 208-13. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.05.015>.

De Schryver, E., L. Derycke, L. Calus, et al. 2017. « The Effect of Systemic Treatments on Periostin Expression Reflects Their Interference with the Eosinophilic Inflammation in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *Rhinology* 55 (2): 152-60. <https://doi.org/10.4193/Rhin16.314>.

Deane, R., Abhay Sagare, Katie Hamm, et al. 2005. « IgG-Assisted Age-Dependent Clearance of Alzheimer's Amyloid Beta Peptide by the Blood-Brain Barrier Neonatal Fc Receptor ». *The Journal of Neuroscience* 25 (50): 11495-503. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3697-05.2005>.

Deisenhofer, J. 1981. « Crystallographic Refinement and Atomic Models of a Human Fc Fragment and Its Complex with Fragment B of Protein A from Staphylococcus Aureus at 2.9- and 2.8-Å Resolution ». *Biochemistry* 20 (9): 2361-70.

Deleuran, Mette, Malene Hvid, Kaare Kemp, et al. 2012. « IL-25 Induces Both Inflammation and Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis ». *Chemical Immunology and Allergy* 96: 45-49. <https://doi.org/10.1159/000331871>.

Derrick, J. P., et D. B. Wigley. 1992. « Crystal Structure of a Streptococcal Protein G Domain Bound to an Fab Fragment ». *Nature* 359 (6397): 752-54. <https://doi.org/10.1038/359752a0>.

Derycke, L., N. Zhang, G. Holtappels, T. Dutré, et C. Bachert. 2012. « IL-17A as a Regulator of Neutrophil Survival in Nasal Polyp Disease of Patients with and without Cystic Fibrosis ». *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 11 (3): 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2011.11.007>.

Derycke, L., Stefanie Eyerich, Koen Van Crombruggen, et al. 2014. « Mixed T Helper Cell Signatures in Chronic Rhinosinusitis with and without Polyps ». *PloS One* 9 (6): e97581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097581>.

Dhuria, Shyeilla V., Leah R. Hanson, et William H. Frey. 2010. « Intranasal Delivery to the Central Nervous System: Mechanisms and Experimental Considerations ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (4): 1654-73. <https://doi.org/10.1002/jps.21924>.

Di Santo, J. P., R. Kühn, et W. Müller. 1995. « Common Cytokine Receptor Gamma Chain (Gamma c)-Dependent Cytokines: Understanding *in vivo* Functions by Gene Targeting ». *Immunological Reviews* 148 (décembre): 19-34. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1995.tb00091.x>.

Di Scipio, R. G., K. Kurachi, et E. W. Davie. 1978. « Activation of Human Factor IX (Christmas Factor) ». *The Journal of Clinical Investigation* 61 (6): 1528-38. <https://doi.org/10.1172/JCI109073>.

Dickinson, B. L., K. Badizadegan, Z. Wu, J. C. Ahouse, et al. 1999. « Bidirectional FcRn-Dependent IgG Transport in a Polarized Human Intestinal Epithelial Cell Line ». *The Journal of Clinical Investigation* 104 (7): 903-11. <https://doi.org/10.1172/JCI6968>.

Dilidaer, X., Yan Zheng, Zhuofu Liu, et al. 2017. « Increased BAFF Expression in Nasal Polyps Is Associated with Local IgE Production, Th2 Response and Concomitant Asthma ». *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 274 (4): 1883-90. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4435-1>.

DiMichele, D. M., W. K. Hoots, S. W. Pipe, et al. 2007. « International Workshop on Immune Tolerance Induction: Consensus Recommendations ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 13 Suppl 1 (juillet): 1-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2007.01497.x>.

Dodd, J. S., Eda Lum, John Goulding, et al. 2009. « IL-9 Regulates Pathology during Primary and

- Memory Responses to Respiratory Syncytial Virus Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (11): 7006-13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900085>.
- Dogan, Murat, Mustafa Sahin, et Cigdem Yenisey. 2019. « Increased TSLP, IL-33, IL-25, IL-19, IL 21 and Amphiregulin (AREG) Levels in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyp ». *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 276 (6): 1685-91. <https://doi.org/10.1007/s00405-019-05379-8>.
- Dorman, Sandra C., Ann Efthimiadis, Irene Babirad, *et al.* 2004. « Sputum CD34+IL-5Ralpha+ Cells Increase after Allergen: Evidence for in Situ Eosinophilopoiesis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169 (5): 573-77. <https://doi.org/10.1164/rccm.200307-1004OC>.
- Dranoff, Glenn. 2004. « Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy ». *Nature Reviews. Cancer* 4 (1): 11-22. <https://doi.org/10.1038/nrc1252>.
- Druez, C., P. Coulie, C. Uyttenhove, et J. Van Snick. 1990. « Functional and Biochemical Characterization of Mouse P40/IL-9 Receptors ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145 (8): 2494-99.
- Drunen, Cornelis M. van, Susanne Reinartz, Jochem Wigman, et Wytse J. Fokkens. 2009. « Inflammation in Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis ». *Immunology and Allergy Clinics of North America* 29 (4): 621-29. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2009.07.003>.
- Dumont, Jennifer A., Alan J. Bitonti, Darren Clark, Sean Evans, *et al.* 2005. « Delivery of an Erythropoietin-Fc Fusion Protein by Inhalation in Humans through an Immunoglobulin Transport Pathway ». *Journal of Aerosol Medicine* 18 (3): 294-303. <https://doi.org/10.1089/jam.2005.18.294>.
- DuPage, Michel, et Jeffrey A. Bluestone. 2016. « Harnessing the Plasticity of CD4(+) T Cells to Treat Immune-Mediated Disease ». *Nature Reviews. Immunology* 16 (3): 149-63. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.18>.
- Easthope, S., et B. Jarvis. 2001. « Omalizumab ». *Drugs* 61 (2): 253-60; discussion 261. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161020-00008>.
- Ebbo, Mikaël, Adeline Crinier, Frédéric Vély, et Eric Vivier. 2017. « Innate Lymphoid Cells: Major Players in Inflammatory Diseases ». *Nature Reviews. Immunology* 17 (11): 665-78. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.86>.
- Ebner, Susanne, Van Anh Nguyen, Markus Forstner, *et al.* 2007. « Thymic Stromal Lymphopoietin Converts Human Epidermal Langerhans Cells into Antigen-Presenting Cells That Induce Proallergic T Cells ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (4): 982-90. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.01.003>.
- Egan, R. W., D. Athwal, M. W. Bodmer, *et al.* 1999. « Effect of Sch 55700, a Humanized Monoclonal Antibody to Human Interleukin-5, on Eosinophilic Responses and Bronchial Hyperreactivity ». *Arzneimittel-Forschung* 49 (9): 779-90. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1300502>.
- Elwany, S., M. Hisham, et R. Gamaee. 1998. « The Effect of Endoscopic Sinus Surgery on Mucociliary Clearance in Patients with Chronic Sinusitis ». *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 255 (10): 511-14. <https://doi.org/10.1007/s004050050109>.
- Elyaman, Wassim, Elizabeth M. Bradshaw, Catherine Uyttenhove, *et al.* 2009. « IL-9 Induces Differentiation of TH17 Cells and Enhances Function of FoxP3+ Natural Regulatory T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 12885-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812530106>.
- Engelhardt, Lucas, Martina Röhm, Chrystelle Mavoungou, *et al.* 2016. « First Steps to Develop and Validate a CFPD Model in Order to Support the Design of Nose-to-Brain Delivered Biopharmaceuticals ». *Pharmaceutical Research* 33 (6): 1337-50. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1875-7>.
- England, R. J., J. J. Homer, L. C. Knight, et S. R. Ell. 1999. « Nasal PH Measurement: A Reliable and Repeatable Parameter ». *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* 24 (1): 67-68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.1999.00223.x>.
- Enjolras, N., E. Perot, S. Le Quellec, *et al.* 2015. « In vivo Efficacy of Human Recombinant Factor IX Produced by the Human Hepatoma Cell Line HuH-7 ». *Haemophilia* 21 (4): e317-321. <https://doi.org/10.1111/hae.12688>.
- Erjefält, J. S., I. Erjefält, F. Sundler, et C. G. Persson. 1995. « In vivo Restitution of Airway Epithelium ». *Cell and Tissue Research* 281 (2): 305-16. <https://doi.org/10.1007/BF00583399>.
- Evans, M. J., R. A. Cox, Q. Zhu, *et al.* 1993. « Organization of Cytokeratin Intermediate Filaments in Basal Cells of Growing Rat Trachea ». *Tissue & Cell* 25 (2): 159-64. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(93\)90015-d](https://doi.org/10.1016/0040-8166(93)90015-d).
- Evatt, B. L., A. Farrugia, A. D. Shapiro, et J. T. Wilde. 2002. « Haemophilia 2002: Emerging Risks of Treatment ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 8 (3): 221-29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2002.00612.x>.
- Fahy, J. V., H. E. Fleming, H. H. Wong, *et al.* 1997. « The Effect of an Anti-IgE Monoclonal Antibody on the Early- and Late-Phase Responses to Allergen Inhalation in Asthmatic Subjects ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (6): 1828-34. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.6.9196082>.
- Fahy, John V., et Burton F. Dickey. 2010. « Airway Mucus Function and Dysfunction ». *The New England Journal of Medicine* 363 (23): 2233-47. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910061>.

- Feldman, B. M., M. Pai, G. E. Rivard, *et al.* 2006. « Tailored Prophylaxis in Severe Hemophilia A: Interim Results from the First 5 Years of the Canadian Hemophilia Primary Prophylaxis Study ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 4 (6): 1228-36. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01953.x>.
- Feldman, S., R. Kasjanski, J. Poposki, *et al.* 2017. « Chronic Airway Inflammation Provides a Unique Environment for B Cell Activation and Antibody Production ». *Clinical and Experimental Allergy* 47 (4): 457-66. <https://doi.org/10.1111/cea.12878>.
- Fermanian, J. 2005. « Validation of assessment scales in physical medicine and rehabilitation: how are psychometric properties determined? ». *Annales De Readaptation Et De Medecine Physique* 48 (6): 281-87. <https://doi.org/10.1016/j.annrmp.2005.04.004>.
- Fieux, M., Q. Lisan, J. Nevoux, *et al.* 2022. « French Health Insurance Data for Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps between 2011 and 2018: A STROBE-Compliant Analysis ». *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, août, S1879-7296(22)00089-8. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2022.08.001>.
- Fink, A., J. Kosecoff, M. Chassin, et R. H. Brook. 1984. « Consensus Methods: Characteristics and Guidelines for Use ». *American Journal of Public Health* 74 (9): 979-83. <https://doi.org/10.2105/ajph.74.9.979>.
- Firan, M., R. Bawdon, C. Radu, *et al.* 2001. « The MHC Class I-Related Receptor, FcRn, Plays an Essential Role in the Maternofetal Transfer of Gamma-Globulin in Humans ». *International Immunology* 13 (8): 993-1002. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.8.993>.
- Fischer, Kathelijn, Roshni Kulkarni, Beatrice Nolan, *et al.* 2017. « Recombinant Factor IX Fc Fusion Protein in Children with Haemophilia B (Kids B-LONG): Results from a Multicentre, Non-Randomised Phase 3 Study ». *The Lancet. Haematology* 4 (2): e75-82. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(16\)30193-4](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(16)30193-4).
- FitzGerald, J. Mark, Eugene R. Bleecker, Parameswaran Nair, *et al.* 2016. « Benralizumab, an Anti-Interleukin-5 Receptor  $\alpha$  Monoclonal Antibody, as Add-on Treatment for Patients with Severe, Uncontrolled, Eosinophilic Asthma (CALIMA): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trial ». *Lancet (London, England)* 388 (10056): 2128-41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31322-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31322-8).
- Fliegeauf, Manfred, Thomas Benzing, et Heymut Omran. 2007. « When Cilia Go Bad: Cilia Defects and Ciliopathies ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (11): 880-93. <https://doi.org/10.1038/nrm2278>.
- Fokkens, W. J., V. J. Lund, C. Hopkins, *et al.* 2020. « European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020 ». *Rhinology* 58 (Suppl S29): 1-464. <https://doi.org/10.4193/Rhin20.600>.
- Fokkens, W. J., A.-S. Viskens, V. Backer, *et al.* 2023. « EPOS/EUFOREA Update on Indication and Evaluation of Biologics in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps 2023 ». *Rhinology*, mars. <https://doi.org/10.4193/Rhin22.489>.
- Fokkens, W. J., Valerie Lund, Claus Bachert, *et al.* 2019. « EUFOREA Consensus on Biologics for CRSwNP with or without Asthma ». *Allergy* 74 (12): 2312-19. <https://doi.org/10.1111/all.13875>.
- Fort, M. M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, *et al.* 2001. « IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies *in vivo* ». *Immunity* 15 (6): 985-95. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00243-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00243-6).
- Fowler, J., L. Vinall, et D. Swallow. 2001. « Polymorphism of the Human Muc Genes ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 6 (octobre): D1207-1215. <https://doi.org/10.2741/A674>.
- Fritz, Dominik K., Christine Kerr, Ramzi Fattouh, *et al.* 2011. « A Mouse Model of Airway Disease: Oncostatin M-Induced Pulmonary Eosinophilia, Goblet Cell Hyperplasia, and Airway Hyperresponsiveness Are STAT6 Dependent, and Interstitial Pulmonary Fibrosis Is STAT6 Independent ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (2): 1107-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903476>.
- Fujieda, Shigeharu, Shoji Matsune, Sachio Takeno, *et al.* 2022. « Dupilumab Efficacy in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps from SINUS-52 Is Unaffected by Eosinophilic Status ». *Allergy* 77 (1): 186-96. <https://doi.org/10.1111/all.14906>.
- Fulkerson, Patricia C., et Marc E. Rothenberg. 2013. « Targeting Eosinophils in Allergy, Inflammation and Beyond ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 12 (2): 117-29. <https://doi.org/10.1038/nrd3838>.
- Gandhi, Namita A., Gianluca Pirozzi, et Neil M. H. Graham. 2017. « Commonality of the IL-4/IL-13 Pathway in Atopic Diseases ». *Expert Review of Clinical Immunology* 13 (5): 425-37. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1298443>.
- Ganesan, Shyamala, Adam T. Comstock, et Uma S. Sajjan. 2013. « Barrier Function of Airway Tract Epithelium ». *Tissue Barriers* 1 (4): e24997. <https://doi.org/10.4161/tisb.24997>.
- Gavin, Marc, et Alexander Rudensky. 2003. « Control of Immune Homeostasis by Naturally Arising Regulatory CD4<sup>+</sup> T Cells ». *Current Opinion in Immunology* 15 (6): 690-96. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.09.011>.
- Gazel, Alix, Martin Rosdy, Béatrice Bertino, *et al.* 2006. « A Characteristic Subset of Psoriasis-Associated Genes Is Induced by Oncostatin-M in Reconstituted Epidermis ». *The Journal of Investigative Dermatology* 126 (12): 2647-57. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700461>.
- Gessner, A., H. Blum, et M. Röllinghoff. 1993. « Differential Regulation of IL-9-Expression after Infection with Leishmania Major in Susceptible and Resistant Mice ». *Immunobiology* 189 (5): 419-35.

[https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80414-6](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80414-6).

Getman, Kate E., et Joseph P. Balthasar. 2005. « Pharmacokinetic Effects of 4C9, an Anti-FcRn Antibody, in Rats: Implications for the Use of FcRn Inhibitors for the Treatment of Humoral Autoimmune and Alloimmune Conditions ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94 (4): 718-29. <https://doi.org/10.1002/jps.20297>.

Gevaert, P., G. Holtappels, S. G. O. Johansson, et al. 2005. « Organization of Secondary Lymphoid Tissue and Local IgE Formation to Staphylococcus Aureus Enterotoxins in Nasal Polyp Tissue ». *Allergy* 60 (1): 71-79. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00621.x>.

Gevaert, P., K. T. Nouri-Aria, H. Wu, et al. 2013. « Local Receptor Revision and Class Switching to IgE in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *Allergy* 68 (1): 55-63. <https://doi.org/10.1111/all.12054>.

Gevaert, P., Lien Calus, Thibaut Van Zele, et al. 2013. « Omalizumab Is Effective in Allergic and Nonallergic Patients with Nasal Polyps and Asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (1): 110-116.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.047>.

Gevaert, P., Doris Lang-Loidolt, Andreas Lackner, et al. 2006. « Nasal IL-5 Levels Determine the Response to Anti-IL-5 Treatment in Patients with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118 (5): 1133-41. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.05.031>.

Gevaert, P., Theodore A. Omachi, Jonathan Corren, et al. 2020. « Efficacy and Safety of Omalizumab in Nasal Polyposis: 2 Randomized Phase 3 Trials ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 146 (3): 595-605. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.032>.

Gevaert, P., Rebecca Saenz, Jonathan Corren, et al. 2022. « Long-Term Efficacy and Safety of Omalizumab for Nasal Polyposis in an Open-Label Extension Study ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 149 (3): 957-965.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.07.045>.

Gevaert, P., Nicholas Van Bruaene, Tom Cattaert, et al. 2011. « Mepolizumab, a Humanized Anti-IL-5 MAb, as a Treatment Option for Severe Nasal Polyposis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (5): 989-995.e1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.056>.

Gheber, L., et Z. Priel. 1994. « Metachronal Activity of Cultured Mucociliary Epithelium under Normal and Stimulated Conditions ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 28 (4): 333-45. <https://doi.org/10.1002/cm.970280407>.

Gheber, L., et Z. Priel. 1997. « Extraction of Cilium Beat Parameters by the Combined Application of Photoelectric Measurements and Computer Simulation ». *Biophysical Journal* 72 (1): 449-62. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78686-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78686-7).

Ghetie, V., et E. S. Ward. 1997. « FcRn: The MHC Class I-Related Receptor That Is More than an IgG Transporter ». *Immunology Today* 18 (12): 592-98. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(97\)01172-9](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(97)01172-9).

Gieseck, Richard L., Mark S. Wilson, et Thomas A. Wynn. 2018. « Type 2 Immunity in Tissue Repair and Fibrosis ». *Nature Reviews. Immunology* 18 (1): 62-76. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.90>.

Gill, J. C. 1999. « The Role of Genetics in Inhibitor Formation ». *Thrombosis and Haemostasis* 82 (2): 500-504.

Golebski, K., Joost van Tongeren, Danielle van Egmond, et al. 2016. « Specific Induction of TSLP by the Viral RNA Analogue Poly(I:C) in Primary Epithelial Cells Derived from Nasal Polyps ». *PloS One* 11 (4): e0152808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152808>.

Gomperts, Brigitte N., Linda J. Kim, Scott A. Flaherty, et Brian P. Hackett. 2007. « IL-13 Regulates Cilia Loss and Foxj1 Expression in Human Airway Epithelium ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 37 (3): 339-46. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0400OC>.

Gong, Fang, Yu-Hong Pan, Xuan Huang, et al. 2017. « From Bench to Bedside: Therapeutic Potential of Interleukin-9 in the Treatment of Asthma ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 13 (2): 389-94. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4024>.

Goswami, Ritobrata, et Mark H. Kaplan. 2011. « A Brief History of IL-9 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (6): 3283-88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003049>.

Gounni, Abdelilah Soussi, Qutayba Hamid, Sahidur M. Rahman, et al. 2004. « IL-9-Mediated Induction of Eotaxin1/CCL11 in Human Airway Smooth Muscle Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (4): 2771-79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2771>.

Gouw, S. C., H. M. van den Berg, S. le Cessie, et J. G. van der Bom. 2007. « Treatment Characteristics and the Risk of Inhibitor Development: A Multicenter Cohort Study among Previously Untreated Patients with Severe Hemophilia A ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 5 (7): 1383-90. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02595.x>.

Gouw, S. C., H. Marijke van den Berg, Kathelijnn Fischer, et al. 2013. « Intensity of Factor VIII Treatment and Inhibitor Development in Children with Severe Hemophilia A: The RODIN Study ». *Blood* 121 (20): 4046-55. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457036>.

Gray, P. W., et D. V. Goeddel. 1982. « Structure of the Human Immune Interferon Gene ». *Nature* 298 (5877): 859-63. <https://doi.org/10.1038/298859a0>.

Green, A., L. A. Smallman, A. C. Logan, et A. B. Drake-Lee. 1995. « The Effect of Temperature on Nasal

Ciliary Beat Frequency ». *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* 20 (2): 178-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2273.1995.tb00040.x>.

Gregory, L. G., Carla P. Jones, Simone A. Walker, *et al.* 2013. « IL-25 Drives Remodelling in Allergic Airways Disease Induced by House Dust Mite ». *Thorax* 68 (1): 82-90. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202003>.

Grohmann, U., J. Van Snick, F. Campanile, S. Silla, *et al.* 2000. « IL-9 Protects Mice from Gram-Negative Bacterial Shock: Suppression of TNF-Alpha, IL-12, and IFN-Gamma, and Induction of IL-10 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (8): 4197-4203. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.8.4197>.

Grosse-Onnebrink, Joerg, Claudius Werner, Niki Tomas Loges, *et al.* 2016. « Effect of TH2 Cytokines and Interferon Gamma on Beat Frequency of Human Respiratory Cilia ». *Pediatric Research* 79 (5): 731-35. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.8>.

Gruenert, D. C., W. E. Finkbeiner, et J. H. Widdicombe. 1995. « Culture and Transformation of Human Airway Epithelial Cells ». *The American Journal of Physiology* 268 (3 Pt 1): L347-360. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.3.L347>.

Gubernatorova, E. O., Ekaterina A. Gorshkova, Olga A. Namakanova, *et al.* 2018. « Non-Redundant Functions of IL-6 Produced by Macrophages and Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 9: 2718. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02718>.

Gudis, David, Ke-qing Zhao, et Noam A. Cohen. 2012. « Acquired Cilia Dysfunction in Chronic Rhinosinusitis ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 26 (1): 1-6. <https://doi.org/10.2500/ajra.2012.26.3716>.

Gueye, Yatma, Lotfi Ferhat, Oualid Sbai, *et al.* 2011. « Trafficking and Secretion of Matrix Metalloproteinase-2 in Olfactory Ensheathing Glial Cells: A Role in Cell Migration? » *Glia* 59 (5): 750-70. <https://doi.org/10.1002/glia.21146>.

Guilleminault, L., N. Azzopardi, C. Arnoult, *et al.* 2014. « Fate of Inhaled Monoclonal Antibodies after the Deposition of Aerosolized Particles in the Respiratory System ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 196 (décembre): 344-54. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.003>.

Guilloteau, Karline, Isabelle Paris, Nathalie Pedretti, *et al.* 2010. « Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 $\alpha$ , and TNF- $\alpha$  Recapitulates Some Features of Psoriasis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (9): 5263-70. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902464>.

Gurbaxani, Brian, Miroslav Dostalek, et Iain Gardner. 2013. « Are Endosomal Trafficking Parameters Better Targets for Improving MAb Pharmacokinetics than FcRn Binding Affinity? » *Molecular Immunology* 56 (4): 660-74. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.008>.

Haenuki, Yoko, Kazufumi Matsushita, Shizue Futatsugi-Yumikura, *et al.* 2012. « A Critical Role of IL-33 in Experimental Allergic Rhinitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (1): 184-194.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.013>.

Halim, Timotheus Y. F., You Yi Hwang, Seth T. Scanlon, *et al.* 2016. « Group 2 Innate Lymphoid Cells License Dendritic Cells to Potentiate Memory TH2 Cell Responses ». *Nature Immunology* 17 (1): 57-64. <https://doi.org/10.1038/ni.3294>.

Hamilos, Daniel L. 2014. « Host-Microbial Interactions in Patients with Chronic Rhinosinusitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (3): 640-653.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.049>.

Hammad, Hamida, et Bart N Lambrecht. 2015. « Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity ». *Immunity* 43 (1): 29-40.

Han, Joseph K., Claus Bachert, Wytske Fokkens, *et al.* 2021. « Mepolizumab for Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps (SYNAPSE): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial ». *The Lancet. Respiratory Medicine*, avril. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00097-7).

Hanley, J., A. McKernan, M. D. Creagh, *et al.* 2017. « Guidelines for the Management of Acute Joint Bleeds and Chronic Synovitis in Haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO) Guideline ». *Haemophilia* 23 (4): 511-20. <https://doi.org/10.1111/hae.13201>.

Hanlon, Megan M., Tatsiana Rakovich, Clare C. Cunningham, *et al.* 2019. « STAT3 Mediates the Differential Effects of Oncostatin M and TNF $\alpha$  on RA Synovial Fibroblast and Endothelial Cell Function ». *Frontiers in Immunology* 10: 2056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02056>.

Hansen, Ryan J., et Joseph P. Balthasar. 2002a. « Effects of Intravenous Immunoglobulin on Platelet Count and Antiplatelet Antibody Disposition in a Rat Model of Immune Thrombocytopenia ». *Blood* 100 (6): 2087-93.

Hansen, Ryan J., et Joseph P. 2002b. « Intravenous Immunoglobulin Mediates an Increase in Anti-Platelet Antibody Clearance via the FcRn Receptor ». *Thrombosis and Haemostasis* 88 (6): 898-99.

Hasegawa, M., S. Sato, M. Fujimoto, *et al.* 1998. « Serum Levels of Interleukin 6 (IL-6), Oncostatin M, Soluble IL-6 Receptor, and Soluble Gp130 in Patients with Systemic Sclerosis ». *The Journal of Rheumatology* 25 (2): 308-13.

Haute Autorité de Santé. 2019. « Protocole national de diagnostic et de soins (PNDS) hémophilie ». <https://mhemmo.fr/documentation/les-referentiels/>.

- Hedman, J., J. Kaprio, T. Poussa, et M. M. Nieminen. 1999. « Prevalence of Asthma, Aspirin Intolerance, Nasal Polyposis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a Population-Based Study ». *International Journal of Epidemiology* 28 (4): 717-22. <https://doi.org/10.1093/ije/28.4.717>.
- Heidl, Sara, Isabella Ellinger, Verena Niederberger, et al. 2016. « Localization of the Human Neonatal Fc Receptor (FcRn) in Human Nasal Epithelium ». *Protoplasma* 253 (6): 1557-64. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0918-y>.
- Heni, Martin, Robert Wagner, Stephanie Kullmann, et al. 2014. « Central Insulin Administration Improves Whole-Body Insulin Sensitivity via Hypothalamus and Parasympathetic Outputs in Men ». *Diabetes* 63 (12): 4083-88. <https://doi.org/10.2337/db14-0477>.
- Henry, Everett K., Juan M. Inclan-Rico, et Mark C. Siracusa. 2017. « Type 2 Cytokine Responses: Regulating Immunity to Helminth Parasites and Allergic Inflammation ». *Current Pharmacology Reports* 3 (6): 346-59. <https://doi.org/10.1007/s40495-017-0114-1>.
- Herard, A. L., J. M. Zahm, D. Pierrot, et al. 1996. « Epithelial Barrier Integrity during *in vitro* Wound Repair of the Airway Epithelium ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 15 (5): 624-32. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.15.5.8918369>.
- Hill, David B., Vinay Swaminathan, Ashley Estes, et al. 2010. « Force Generation and Dynamics of Individual Cilia under External Loading ». *Biophysical Journal* 98 (1): 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.048>.
- Hogan, Simon P., Helene F. Rosenberg, Redwan Moqbel, et al. 2008. « Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease ». *Clinical and Experimental Allergy* 38 (5): 709-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02958.x>.
- Homma, Tetsuya, Atsushi Kato, Masafumi Sakashita, et al. 2017. « Potential Involvement of the Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Epiregulin and Matrix Metalloproteinase-1 in Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 57 (3): 334-45. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0325OC>.
- Hopkins, Ann M., Matthias Bruewer, G. Thomas Brown, et al. 2004. « Epithelial Cell Spreading Induced by Hepatocyte Growth Factor Influences Paxillin Protein Synthesis and Posttranslational Modification ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (4): G886-898. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00065.2004>.
- Hopkins, C., S. Gillett, R. Slack, et al. 2009. « Psychometric Validity of the 22-Item Sinonasal Outcome Test ». *Clinical Otolaryngology: Official Journal of ENT-UK; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* 34 (5): 447-54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01995.x>.
- Hopkins, C., Robert Slack, Valerie Lund, et al. 2009. « Long-Term Outcomes from the English National Comparative Audit of Surgery for Nasal Polyposis and Chronic Rhinosinusitis ». *The Laryngoscope* 119 (12): 2459-65. <https://doi.org/10.1002/lary.20653>.
- Hu, Haili, et Haixia Li. 2018. « Prunetin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokine Production and MUC5AC Expression by Inactivating the TLR4/MyD88 Pathway in Human Nasal Epithelial Cells ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106 (octobre): 1469-77. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.093>.
- Hu, Xiaoyu, et Lionel B. Ivashkiv. 2009. « Cross-Regulation of Signaling Pathways by Interferon-Gamma: Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases ». *Immunity* 31 (4): 539-50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.002>.
- Hu, Ying, Ping-Ping Cao, Geng-Tian Liang, et al. 2012. « Diagnostic Significance of Blood Eosinophil Count in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps in Chinese Adults ». *The Laryngoscope* 122 (3): 498-503. <https://doi.org/10.1002/lary.22507>.
- Hua, Xiaoyang, Warren C. Naselsky, William D. Bennett, et al. 2013. « Adenosine Increases Nasal Mucociliary Clearance Rate in Mice through A2A and A2B Adenosine Receptors ». *The Laryngoscope* 123 (2): 306-10. <https://doi.org/10.1002/lary.23586>.
- Hültner, L., C. Druez, J. Moeller, et al. 1990. « Mast Cell Growth-Enhancing Activity (MEA) Is Structurally Related and Functionally Identical to the Novel Mouse T Cell Growth Factor P40/TCGFIII (Interleukin 9) ». *European Journal of Immunology* 20 (6): 1413-16. <https://doi.org/10.1002/eji.1830200632>.
- Huriyati, Effy, Eryati Darwin, Yanwirasti Yanwirasti, et Irza Wahid. 2019. « Association of Inflammation Mediator in Mucosal and Tissue of Chronic Rhinosinusitis with Recurrent Nasal Polyp ». *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 7 (10): 1635-40. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.327>.
- Hurst, Stephen D., Tony Muchamuel, Daniel M. Gorman, et al. 2002. « New IL-17 Family Members Promote Th1 or Th2 Responses in the Lung: *In vivo* Function of the Novel Cytokine IL-25 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (1): 443-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.443>.
- Huston, David P., et Yong Jun Liu. 2006. « Thymic Stromal Lymphopoietin: A Potential Therapeutic Target for Allergy and Asthma ». *Current Allergy and Asthma Reports* 6 (5): 372-76. <https://doi.org/10.1007/s11882-996-0006-7>.
- Hvid, Malene, Christian Vestergaard, Kaare Kemp, et al. 2011. « IL-25 in Atopic Dermatitis: A Possible

- Link between Inflammation and Skin Barrier Dysfunction? » *The Journal of Investigative Dermatology* 131 (1): 150-57. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.277>.
- Hvidtfeldt, Morten, Asger Sverrild, Alexis Pulga, *et al.* 2023. « Airway Hyperresponsiveness Reflects Corticosteroid-Sensitive Mast Cell Involvement across Asthma Phenotypes ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, mars, S0091-6749(23)00291-9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.03.001>.
- Ickrath, Pascal, Norbert Kleinsasser, Xin Ding, *et al.* 2018. « Accumulation of CD69+ Tissue-resident Memory T Cells in the Nasal Polyps of Patients with Chronic Rhinosinusitis ». *International Journal of Molecular Medicine* 42 (2): 1116-24. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3653>.
- Idusogie, E. E., L. G. Presta, H. Gazzano-Santoro, *et al.* 2000. « Mapping of the C1q Binding Site on Rituxan, a Chimeric Antibody with a Human IgG1 Fc ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (8): 4178-84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.8.4178>.
- Ilmarinen, Pinja, Eeva Moilanen, et Hannu Kankaanranta. 2014. « Regulation of Spontaneous Eosinophil Apoptosis-a Neglected Area of Importance ». *Journal of Cell Death* 7: 1-9. <https://doi.org/10.4137/JCD.S13588>.
- Ingram, Jennifer L., et Monica Kraft. 2012. « IL-13 in Asthma and Allergic Disease: Asthma Phenotypes and Targeted Therapies ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (4): 829-42; quiz 843-44. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.034>.
- Ishida, Akihiro, Nobuo Ohta, Yusuke Suzuki, *et al.* 2012. « Expression of Pendrin and Periostin in Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis ». *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 61 (4): 589-95. <https://doi.org/10.2332/allergolint.11-OA-0370>.
- Ishino, Tetsuya, Adrian E. Harrington, Hosahudya Gopi, et Irwin Chaiken. 2008. « Structure-Based Rationale for Interleukin 5 Receptor Antagonism ». *Current Pharmaceutical Design* 14 (12): 1231-39. <https://doi.org/10.2174/138161208784246144>.
- Ishitoya, Junichi, Yasunori Sakuma, et Mamoru Tsukuda. 2010. « Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis in Japan ». *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 59 (3): 239-45. <https://doi.org/10.2332/allergolint.10-RAI-0231>.
- Izuhara, K., K. Arima, et S. Yasunaga. 2002. « IL-4 and IL-13: Their Pathological Roles in Allergic Diseases and Their Potential in Developing New Therapies ». *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy* 1 (3): 263-69. <https://doi.org/10.2174/1568010023344661>.
- Izuhara, K., Satoshi Nunomura, Yasuhiro Nanri, *et al.* 2019. « Periostin: An Emerging Biomarker for Allergic Diseases ». *Allergy* 74 (11): 2116-28. <https://doi.org/10.1111/all.13814>.
- Izuhara, K., Shoichiro Ohta, et Junya Ono. 2016. « Using Periostin as a Biomarker in the Treatment of Asthma ». *Allergy, Asthma & Immunology Research* 8 (6): 491-98. <https://doi.org/10.4168/air.2016.8.6.491>.
- Jäger, Anneli, Valérie Dardalhon, Raymond A. Sobel, *et al.* 2009. « Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (11): 7169-77. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901906>.
- Jayawickreme, S. P., T. Gray, P. Nettesheim, et T. Eling. 1999. « Regulation of 15-Lipoxygenase Expression and Mucus Secretion by IL-4 in Human Bronchial Epithelial Cells ». *The American Journal of Physiology* 276 (4): L596-603. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.4.L596>.
- Jeanson, L., M. Kelly, A. Coste, *et al.* 2012. « Oxidative Stress Induces Unfolding Protein Response and Inflammation in Nasal Polyposis ». *Allergy* 67 (3): 403-12. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02769.x>.
- Jeanson, L., Ida Chiara Guerrero, Jean-François Papon, *et al.* 2014. « Proteomic Analysis of Nasal Epithelial Cells from Cystic Fibrosis Patients ». *PloS One* 9 (9): e108671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108671>.
- Jeffe, Jill S., Sudarshan Seshadri, Kevin J. Hamill, *et al.* 2013. « A Role for Anti-BP180 Autoantibodies in Chronic Rhinosinusitis ». *The Laryngoscope* 123 (9): 2104-11. <https://doi.org/10.1002/lary.24016>.
- Jetten, A. M. 1991. « Growth and Differentiation Factors in Tracheobronchial Epithelium ». *The American Journal of Physiology* 260 (6 Pt 1): L361-373. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1991.260.6.L361>.
- Jiao, J., S. Duan, N. Meng, *et al.* 2016. « Role of IFN- $\gamma$ , IL-13, and IL-17 on Mucociliary Differentiation of Nasal Epithelial Cells in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *Clinical and Experimental Allergy* 46 (3): 449-60. <https://doi.org/10.1111/cea.12644>.
- Jiao, Jian, Chengshuo Wang, et Luo Zhang. 2019. « Epithelial Physical Barrier Defects in Chronic Rhinosinusitis ». *Expert Review of Clinical Immunology* 15 (6): 679-88. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2019.1601556>.
- Jiao, Jian, Ming Wang, Su Duan, *et al.* 2018. « Transforming Growth Factor-B1 Decreases Epithelial Tight Junction Integrity in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (3): 1160-1163.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.045>.
- Jo, Sungsin, Bong Joon Jin, Seung Hoon Lee, *et al.* 2023. « Eosinophil-Derived Interferon- $\gamma$  Drives Transmembrane Protein 119-Induced New Bone Formation in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 13 (3): 242-54. <https://doi.org/10.1002/alf.23076>.
- Johanson, K., E. Appelbaum, M. Doyle, *et al.* 1995. « Binding Interactions of Human Interleukin 5 with

Its Receptor Alpha Subunit. Large Scale Production, Structural, and Functional Studies of Drosophila-Expressed Recombinant Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (16): 9459-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9459>.

Jun, Hye Suk, et Younhee Kang. 2023. « Factors Contributing to Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients' Functional Performance: Structural Equation Modelling Based on Theory of Unpleasant Symptoms ». *Nursing Open* 10 (5): 3132-44. <https://doi.org/10.1002/nop2.1563>.

Junghans, R. P., et C. L. Anderson. 1996. « The Protection Receptor for IgG Catabolism Is the Beta2-Microglobulin-Containing Neonatal Intestinal Transport Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (11): 5512-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5512>.

Junttila, Ilkka S. 2018. « Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes ». *Frontiers in Immunology* 9: 888. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00888>.

Kacha, Sophie, Francis Guillemin, et Roger Jankowski. 2012. « Development and Validity of the DyNaChron Questionnaire for Chronic Nasal Dysfunction ». *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 269 (1): 143-53. <https://doi.org/10.1007/s00405-011-1690-z>.

Kamekura, R., Takashi Kojima, Jun-ichi Koizumi, et al. 2009. « Thymic Stromal Lymphopoietin Enhances Tight-Junction Barrier Function of Human Nasal Epithelial Cells ». *Cell and Tissue Research* 338 (2): 283-93. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0855-1>.

Kamekura, R., Takashi Kojima, Akira Takashima, et al. 2010. « Thymic Stromal Lymphopoietin Induces Tight Junction Protein Claudin-7 via NF-KappaB in Dendritic Cells ». *Histochemistry and Cell Biology* 133 (3): 339-48. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0674-1>.

Kang, Sujin, Toshio Tanaka, et Tadamitsu Kishimoto. 2015. « Therapeutic Uses of Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody ». *International Immunology* 27 (1): 21-29. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu081>.

Kariyawasam, Harsha H. 2019. « Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps: Insights into Mechanisms of Disease from Emerging Biological Therapies ». *Expert Review of Clinical Immunology* 15 (1): 59-71. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2019.1541738>.

Kato, Atsushi, Anju Peters, Lydia Suh, et al. 2008. « Evidence of a Role for B Cell-Activating Factor of the TNF Family in the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (6): 1385-92, 1392.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.03.002>.

Kato, Atsushi, et Robert P. Schleimer. 2007. « Beyond Inflammation: Airway Epithelial Cells Are at the Interface of Innate and Adaptive Immunity ». *Current Opinion in Immunology* 19 (6): 711-20. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.08.004>.

Kawaguchi, Mio, Mitsuru Adachi, Naruhito Oda, et al. 2004. « IL-17 Cytokine Family ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114 (6): 1265-73; quiz 1274. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.10.019>.

Kearley, Jennifer, Jonas S. Erjefalt, Cecilia Andersson, et al. 2011. « IL-9 Governs Allergen-Induced Mast Cell Numbers in the Lung and Chronic Remodeling of the Airways ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (7): 865-75. <https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1462OC>.

Keller, Lea-Adriana, Olivia Merkel, et Andreas Popp. 2022. « Intranasal Drug Delivery: Opportunities and Toxicologic Challenges during Drug Development ». *Drug Delivery and Translational Research* 12 (4): 735-57. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00891-5>.

Keswani, Anjeni, Neha M. Dunn, Angelica Manzur, et al. 2017. « The Clinical Significance of Specific Antibody Deficiency (SAD) Severity in Chronic Rhinosinusitis (CRS) ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice* 5 (4): 1105-11. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2016.11.033>.

Khawar, M. B., Muddasir Hassan Abbasi, et Nadeem Sheikh. 2016. « IL-32: A Novel Pluripotent Inflammatory Interleukin, towards Gastric Inflammation, Gastric Cancer, and Chronic Rhino Sinusitis ». *Mediators of Inflammation* 2016: 8413768. <https://doi.org/10.1155/2016/8413768>.

Khoufache, K., Olivier Puel, Nicolas Loiseau, et al. 2007. « Verruculogen Associated with Aspergillus Fumigatus Hyphae and Conidia Modifies the Electrophysiological Properties of Human Nasal Epithelial Cells ». *BMC Microbiology* 7 (janvier): 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-5>.

Khurana, Nitish, Abigail Pulsipher, Jolanta Jedrzkiewicz, et al. 2021. « Inflammation-Driven Vascular Dysregulation in Chronic Rhinosinusitis ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 11 (6): 976-83. <https://doi.org/10.1002/alr.22723>.

Kim, Chang-Hoon, Kyoung Seob Song, Ja Seok Koo, et al. 2002. « IL-13 Suppresses MUC5AC Gene Expression and Mucin Secretion in Nasal Epithelial Cells ». *Acta Oto-Laryngologica* 122 (6): 638-43. <https://doi.org/10.1080/000164802320396321>.

Kim, Dae Woo, Kyoung Mi Eun, Eun Youn Roh, et al. 2019. « Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps in Asian Patients Shows Mixed Inflammatory Patterns and Neutrophil-Related Disease Severity ». *Mediators of Inflammation* 2019: 7138643. <https://doi.org/10.1155/2019/7138643>.

Kim, Dae Woo, Marianna Kulka, Ara Jo, et al. 2017. « Cross-Talk between Human Mast Cells and Epithelial Cells by IgE-Mediated Periostin Production in Eosinophilic Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (5): 1692-1695.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.026>.

- Kim, J. K., M. Firan, C. G. Radu, *et al.* 1999. « Mapping the Site on Human IgG for Binding of the MHC Class I-Related Receptor, FcRn ». *European Journal of Immunology* 29 (9): 2819-25. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199909\)29:09<2819::AID-IMMU2819>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2819::AID-IMMU2819>3.0.CO;2-6).
- Kim, J. K., M. F. Tsen, V. Ghetie, et E. S. Ward. 1994. « Localization of the Site of the Murine IgG1 Molecule That Is Involved in Binding to the Murine Intestinal Fc Receptor ». *European Journal of Immunology* 24 (10): 2429-34. <https://doi.org/10.1002/eji.1830241025>.
- Kim, J. H., Go Eun Choi, Bong-Jae Lee, *et al.* 2016. « Natural Killer Cells Regulate Eosinophilic Inflammation in Chronic Rhinosinusitis ». *Scientific Reports* 6 (juin): 27615. <https://doi.org/10.1038/srep27615>.
- Kim, J. H., Gye Eun Kim, Gye Song Cho, *et al.* 2013. « Natural Killer Cells from Patients with Chronic Rhinosinusitis Have Impaired Effector Functions ». *PloS One* 8 (10): e77177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077177>.
- Kim, R., George Chang, Rebecca Hu, *et al.* 2016. « Connexin Gap Junction Channels and Chronic Rhinosinusitis ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 6 (6): 611-17. <https://doi.org/10.1002/alr.21717>.
- Kirshner, Julia, Detlef Schumann, et John E. Shively. 2003. « CEACAM1, a Cell-Cell Adhesion Molecule, Directly Associates with Annexin II in a Three-Dimensional Model of Mammary Morphogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (50): 50338-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309115200>.
- Kitchen, S., E. Gray, et K. Mertens. 2014. « Monitoring of Modified Factor VIII and IX Products ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 20 Suppl 4 (mai): 36-42. <https://doi.org/10.1111/hae.12423>.
- Klingberg, Trine Danø, Maja Herold Pedersen, Avrelija Cencic, et Birgitte Bjørn Budde. 2005. « Application of Measurements of Transepithelial Electrical Resistance of Intestinal Epithelial Cell Monolayers to Evaluate Probiotic Activity ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11): 7528-30. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7528-7530.2005>.
- Klion, Amy D., Steven J. Ackerman, et Bruce S. Bochner. 2020. « Contributions of Eosinophils to Human Health and Disease ». *Annual Review of Pathology* 15 (janvier): 179-209. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032756>.
- Klossek, J. M., F. Neukirch, C. Pribil, *et al.* 2005. « Prevalence of Nasal Polyposis in France: A Cross-Sectional, Case-Control Study ». *Allergy* 60 (2): 233-37. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00688.x>.
- Knoops, L., Jamila Louahed, Jacques Van Snick, et Jean-Christophe Renaud. 2005. « IL-9 Promotes but Is Not Necessary for Systemic Anaphylaxis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (1): 335-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.1.335>.
- Knowles, Michael R., et Richard C. Boucher. 2002. « Mucus Clearance as a Primary Innate Defense Mechanism for Mammalian Airways ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (5): 571-77. <https://doi.org/10.1172/JCI15217>.
- Ko, Sung-Youl, Amarendra Pegu, Rebecca S. Rudicell, *et al.* 2014. « Enhanced Neonatal Fc Receptor Function Improves Protection against Primate SHIV Infection ». *Nature* 514 (7524): 642-45. <https://doi.org/10.1038/nature13612>.
- Kojima, Takashi, Mitsuru Go, Ken-ichi Takano, *et al.* 2013. « Regulation of Tight Junctions in Upper Airway Epithelium ». *BioMed Research International* 2013: 947072. <https://doi.org/10.1155/2013/947072>.
- Kong, Deok-Hoon, Young Kwan Kim, Mi Ra Kim, *et al.* 2018. « Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4): 1057. <https://doi.org/10.3390/ijms19041057>.
- Kortekaas Krohn, I., M. M. Shikhagaie, K. Golebski, J. H. Bernink, C. Breynaert, B. Creyns, Z. Diamant, *et al.* 2018. « Emerging Roles of Innate Lymphoid Cells in Inflammatory Diseases: Clinical Implications ». *Allergy* 73 (4): 837-50. <https://doi.org/10.1111/all.13340>.
- Koupenova, Milka, Lauren Clancy, Heather A. Corkrey, et Jane E. Freedman. 2018. « Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis ». *Circulation research* 122 (2): 337-51. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310795>.
- Kowalski, Marek L., Ioana Agache, Sevim Bavbek, Arzu Bakirtas, Miguel Blanca, Grażyna Bochenek, Matteo Bonini, *et al.* 2019. « Diagnosis and Management of NSAID-Exacerbated Respiratory Disease (N-ERD)-a EAACI Position Paper ». *Allergy* 74 (1): 28-39. <https://doi.org/10.1111/all.13599>.
- Krabbendam, Lisette, Suzanne M. Bal, Hergen Spits, et Korneliusz Golebski. 2018. « New Insights into the Function, Development, and Plasticity of Type 2 Innate Lymphoid Cells ». *Immunological Reviews* 286 (1): 74-85. <https://doi.org/10.1111/imr.12708>.
- Krysko, O., G. Holtappels, N. Zhang, M. Kubica, *et al.* 2011. « Alternatively Activated Macrophages and Impaired Phagocytosis of *S. Aureus* in Chronic Rhinosinusitis ». *Allergy* 66 (3): 396-403. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02498.x>.
- Kullmann, Stephanie, Sabine Frank, Martin Heni, *et al.* 2013. « Intranasal Insulin Modulates Intrinsic Reward and Prefrontal Circuitry of the Human Brain in Lean Women ». *Neuroendocrinology* 97 (2): 176-82. <https://doi.org/10.1159/000341406>.

- Kumar, Niyanta N., Jeffrey J. Lochhead, Michelle E. Pizzo, *et al.* 2018. « Delivery of Immunoglobulin G Antibodies to the Rat Nervous System Following Intranasal Administration: Distribution, Dose-Response, and Mechanisms of Delivery ». *Journal of Controlled Release* 286 (septembre): 467-84. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.006>.
- Kung, T. T., D. M. Stelts, J. A. Zurcher, *et al.* 1995. « Involvement of IL-5 in a Murine Model of Allergic Pulmonary Inflammation: Prophylactic and Therapeutic Effect of an Anti-IL-5 Antibody ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13 (3): 360-65. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.13.3.7654390>.
- Kuperman, Douglas A., Xiaozhu Huang, Laura L. Koth, *et al.* 2002. « Direct Effects of Interleukin-13 on Epithelial Cells Cause Airway Hyperreactivity and Mucus Overproduction in Asthma ». *Nature Medicine* 8 (8): 885-89. <https://doi.org/10.1038/nm734>.
- Kusano, Seisuke, Mutsuko Kukimoto-Niino, Nobumasa Hino, *et al.* 2012. « Structural Basis of Interleukin-5 Dimer Recognition by Its  $\alpha$  Receptor ». *Protein Science* 21 (6): 850-64. <https://doi.org/10.1002/pro.2072>.
- Lachowicz-Scroggins, Marrah E., Shaopeng Yuan, *et al.* 2016. « Abnormalities in MUC5AC and MUC5B Protein in Airway Mucus in Asthma ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194 (10): 1296-99. <https://doi.org/10.1164/rccm.201603-0526LE>.
- Ladel, S., Johannes Flamm, Arghavan Soleimani Zadeh, *et al.* 2018. « Allogenic Fc Domain-Facilitated Uptake of IgG in Nasal Lamina Propria: Friend or Foe for Intranasal CNS Delivery? » *Pharmaceutics* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030107>.
- Ladel, S., Patrick Schlossbauer, Johannes Flamm, *et al.* 2019. « Improved *In vitro* Model for Intranasal Mucosal Drug Delivery: Primary Olfactory and Respiratory Epithelial Cells Compared with the Permanent Nasal Cell Line RPMI 2650 ». *Pharmaceutics* 11 (8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080367>.
- Lai, Jesse D., Paul C. Moorehead, Kate Sponagle, *et al.* 2016. « Concurrent Influenza Vaccination Reduces Anti-FVIII Antibody Responses in Murine Hemophilia A ». *Blood* 127 (26): 3439-49. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679282>.
- Laidlaw, T. M., Joaquim Mullol, Katharine M. Woessner, *et al.* 2021. « Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice* 9 (3): 1133-41. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.09.063>.
- Lam, Matthew, Laura Hull, Rohan McLachlan, *et al.* 2013. « Clinical Severity and Epithelial Endotypes in Chronic Rhinosinusitis ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 3 (2): 121-28. <https://doi.org/10.1002/alr.21082>.
- Langer, Harald F., et Meinrad Gawaz. 2008. « Platelet-Vessel Wall Interactions in Atherosclerotic Disease ». *Thrombosis and Haemostasis* 99 (3): 480-86. <https://doi.org/10.1160/TH07-11-0685>.
- Laoukili, J., E. Perret, T. Willems, *et al.* 2001. « IL-13 Alters Mucociliary Differentiation and Ciliary Beating of Human Respiratory Epithelial Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 108 (12): 1817-24. <https://doi.org/10.1172/JCI13557>.
- LaPorte, Sherry L., Z. Sean Juo, Jana Vaclavikova, *et al.* 2008. « Molecular and Structural Basis of Cytokine Receptor Pleiotropy in the Interleukin-4/13 System ». *Cell* 132 (2): 259-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.030>.
- Larsen, P. L., M. Tos, W. Kuijpers, et J. M. van der Beek. 1992. « The Early Stages of Polyp Formation ». *The Laryngoscope* 102 (6): 670-77. <https://doi.org/10.1288/00005537-199206000-00013>.
- Lau, Aden, Susan Lester, Sophia Moraitis, *et al.* 2017. « Tertiary Lymphoid Organs in Recalcitrant Chronic Rhinosinusitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (4): 1371-1373.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.052>.
- Lazard, D. S., A. Moore, V. Hupertan, *et al.* 2009. « Muco-Ciliary Differentiation of Nasal Epithelial Cells Is Decreased after Wound Healing *in vitro* ». *Allergy* 64 (8): 1136-43. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02003.x>.
- Lazard, D. S., Virginie Prulière-Escabasse, Jean-François Papon, *et al.* 2007. « Injury and epithelial wound healing: a pathophysiologic hypothesis for nasal and sinus polyposis ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 36 (7-8): 1104-8. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2007.01.021>.
- Le Floc'h, Audrey, Jeanne Allinne, Kirsten Nagashima, *et al.* 2020. « Dual Blockade of IL-4 and IL-13 with Dupilumab, an IL-4R $\alpha$  Antibody, Is Required to Broadly Inhibit Type 2 Inflammation ». *Allergy* 75 (5): 1188-1204. <https://doi.org/10.1111/all.14151>.
- Le Quellec, S., Nathalie Enjolras, Eloïse Perot, *et al.* 2018. « Fusion of Factor IX to Factor XIII-B Sub-Unit Improves the Pharmacokinetic Profile of Factor IX ». *Thrombosis and Haemostasis* 118 (12): 2053-63. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1675787>.
- Lechapt-Zalcman, E., V. Prulière-Escabasse, D. Advenier, *et al.* 2006. « Transforming Growth Factor-Beta1 Increases Airway Wound Repair via MMP-2 Upregulation: A New Pathway for Epithelial Wound Repair? » *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (6): L1277-1282. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00149.2005>.

- Leckie, M. J., A. ten Brinke, J. Khan, *et al.* 2000. « Effects of an Interleukin-5 Blocking Monoclonal Antibody on Eosinophils, Airway Hyper-Responsiveness, and the Late Asthmatic Response ». *Lancet (London, England)* 356 (9248): 2144-48. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)03496-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)03496-6).
- Lee, Chang-Han, Tae Hyun Kang, Ophélie Godon, *et al.* 2019. « Publisher Correction: An Engineered Human Fc Domain That Behaves like a PH-Toggle Switch for Ultra-Long Circulation Persistence ». *Nature Communications* 10 (1): 5461. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13458-x>.
- Lee, J., W. H. Ho, M. Maruoka, *et al.* 2001. « IL-17E, a Novel Proinflammatory Ligand for the IL-17 Receptor Homolog IL-17Rh1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2): 1660-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008289200>.
- Lee, J. J., E. A. Jacobsen, M. P. McGarry, *et al.* 2010. « Eosinophils in Health and Disease: The LIAR Hypothesis ». *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40 (4): 563-75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03484.x>.
- Lee, Sang-Nam, Ji-Suk Ahn, Seong Gyu Lee, *et al.* 2019. « Integrins Av $\beta$ 5 and Av $\beta$ 6 Mediate IL-4-Induced Collective Migration in Human Airway Epithelial Cells ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 60 (4): 420-33. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0081OC>.
- Lefrançois, Philippe, Hugo Chapdelaine, Benoît Côté, et Martin Desrosiers. 2016. « A Role for Auto-Immunity in Chronic Rhinosinusitis? Lessons Learned from Sub-Epidermal Bullous Disorders of the Skin ». *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology* 12: 38. <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0141-1>.
- Li, Ning, Minglang Zhao, Julio Hilario-Vargas, *et al.* 2005. « Complete FcRn Dependence for Intravenous Ig Therapy in Autoimmune Skin Blistering Diseases ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (12): 3440-50. <https://doi.org/10.1172/JCI24394>.
- Li, Shiyan, Xiaofeng Ding, Hao Zhang, *et al.* 2022. « IL-25 Improves Diabetic Wound Healing through Stimulating M2 Macrophage Polarization and Fibroblast Activation ». *International Immunopharmacology* 106 (mai): 108605. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108605>.
- Li, Tommy, et Joseph P. Balthasar. 2018. « FcRn Expression in Wildtype Mice, Transgenic Mice, and in Human Tissues ». *Biomolecules* 8 (4). <https://doi.org/10.3390/biom8040115>.
- Li, Ying, Xiangdong Wang, Ruihan Wang, *et al.* 2014. « The Expression of Epithelial Intercellular Junctional Proteins in the Sinonasal Tissue of Subjects with Chronic Rhinosinusitis: A Histopathologic Study ». *ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties* 76 (2): 110-19. <https://doi.org/10.1159/000362246>.
- Li, Ying Ying, Chun Wei Li, Siew Shuen Chao, *et al.* 2014. « Impairment of Cilia Architecture and Ciliogenesis in Hyperplastic Nasal Epithelium from Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134 (6): 1282-92. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.038>.
- Li, Zili, Senthilkumar Palaniyandi, Rongyu Zeng, *et al.* 2011. « Transfer of IgG in the Female Genital Tract by MHC Class I-Related Neonatal Fc Receptor (FcRn) Confers Protective Immunity to Vaginal Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (11): 4388-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012861108>.
- Lim, Ai Ing, Thomas Verrier, Christian Aj Vosshenrich, et James P. Di Santo. 2017. « Developmental Options and Functional Plasticity of Innate Lymphoid Cells ». *Current Opinion in Immunology* 44 (février): 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.010>.
- Lim, Hui Fang, et Parameswaran Nair. 2015. « Efficacy and Safety of Reslizumab in Patients with Moderate to Severe Eosinophilic Asthma ». *Expert Review of Respiratory Medicine* 9 (2): 135-42. <https://doi.org/10.1586/17476348.2015.1000867>.
- Liu, Liming, Ana Maria Garcia, Helen Santoro, *et al.* 2007. « Amelioration of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis in Rats by Neonatal FcR Blockade ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (8): 5390-98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5390>.
- Liu, Yong-Jun, Vasilli Soumelis, Norihiko Watanabe, *et al.* 2007. « TSLP: An Epithelial Cell Cytokine That Regulates T Cell Differentiation by Conditioning Dendritic Cell Maturation ». *Annual Review of Immunology* 25: 193-219. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141718>.
- Ljung, Rolf. 2009. « Prophylactic Therapy in Haemophilia ». *Blood Reviews* 23 (6): 267-74. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.08.001>.
- Llop-Guevara, Alba, Derek K. Chu, Tina D. Walker, *et al.* 2014. « A GM-CSF/IL-33 Pathway Facilitates Allergic Airway Responses to Sub-Threshold House Dust Mite Exposure ». *PloS One* 9 (2): e88714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088714>.
- Lloyd Jones, M., J. Wight, S. Paisley, et C. Knight. 2003. « Control of Bleeding in Patients with Haemophilia A with Inhibitors: A Systematic Review ». *Haemophilia* 9 (4): 464-520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00782.x>.
- Lobo, Evelyn D., Ryan J. Hansen, et Joseph P. Balthasar. 2004. « Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93 (11): 2645-68. <https://doi.org/10.1002/jps.20178>.
- Lochhead, Jeffrey J., et Robert G. Thorne. 2012. « Intranasal Delivery of Biologics to the Central Nervous

- System ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (7): 614-28. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002>.
- Lochhead, Jeffrey J., Daniel J. Wolak, Michelle E. Pizzo, et Robert G. Thorne. 2015. « Rapid Transport within Cerebral Perivascular Spaces Underlies Widespread Tracer Distribution in the Brain after Intranasal Administration ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35 (3): 371-81. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.215>.
- Longphre, M., D. Li, M. Gallup, E. Drori, et al. 1999. « Allergen-Induced IL-9 Directly Stimulates Mucin Transcription in Respiratory Epithelial Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 104 (10): 1375-82. <https://doi.org/10.1172/JCI6097>.
- Lötvall, Jan, Cezmi A. Akdis, Leonard B. Bacharier, et al. 2011. « Asthma Endotypes: A New Approach to Classification of Disease Entities within the Asthma Syndrome ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (2): 355-60. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.037>.
- Lou, Hongfei, Yifan Meng, Yingshi Piao, et al. 2015. « Predictive Significance of Tissue Eosinophilia for Nasal Polyp Recurrence in the Chinese Population ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 29 (5): 350-56. <https://doi.org/10.2500/ajra.2015.29.4231>.
- Louahed, J., M. Toda, J. Jen, et al. 2000. « Interleukin-9 Upregulates Mucus Expression in the Airways ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 22 (6): 649-56. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.6.3927>.
- Louahed, J., Y. Zhou, W. L. Maloy, et al. 2001. « Interleukin 9 Promotes Influx and Local Maturation of Eosinophils ». *Blood* 97 (4): 1035-42. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.4.1035>.
- Low, S. C., S. L. Nunes, A. J. Bitonti, et J. A. Dumont. 2005a. « Oral and Pulmonary Delivery of FSH-Fc Fusion Proteins via Neonatal Fc Receptor-Mediated Transcytosis ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 20 (7): 1805-13. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh896>.
- Low, S. C., S. L. Nunes, A. J. Bitonti, et J. A. Dumont. 2005b. « Oral and Pulmonary Delivery of FSH-Fc Fusion Proteins via Neonatal Fc Receptor-Mediated Transcytosis ». *Human Reproduction (Oxford, England)* 20 (7): 1805-13. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh896>.
- Lu, Li, Senthilkumar Palaniyandi, Rongyu Zeng, et al. 2011. « A Neonatal Fc Receptor-Targeted Mucosal Vaccine Strategy Effectively Induces HIV-1 Antigen-Specific Immunity to Genital Infection ». *Journal of Virology* 85 (20): 10542-53. <https://doi.org/10.1128/JVI.05441-11>.
- Lu, Rwei-Min, Yu-Chyi Hwang, I.-Ju Liu, et al. 2020. « Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases ». *Journal of Biomedical Science* 27 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>.
- Lund, V. J., et D. W. Kennedy. 1997. « Staging for Rhinosinusitis ». *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 117 (3 Pt 2): S35-40. [https://doi.org/10.1016/s0194-5998\(97\)70005-6](https://doi.org/10.1016/s0194-5998(97)70005-6).
- Lund, V. J., et I. S. Mackay. 1993a. « Staging in Rhinosinusitis ». *Rhinology* 31 (4): 183-84.
- Lund, V. J., et I. S. Mackay. 1993b. « Staging in Rhinosinusitis ». *Rhinology* 31 (4): 183-84.
- Luskin, Allan T., Mark Kosinski, Brian W. Bresnahan, et al. 2005. « Symptom Control and Improved Functioning: The Effect of Omalizumab on Asthma-Related Quality of Life (ARQL) ». *The Journal of Asthma* 42 (10): 823-27. <https://doi.org/10.1080/02770900500369868>.
- Macri, G. F., A. Greco, C. Marinelli, et al. 2014. « Evidence and Role of Autoantibodies in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 27 (2): 155-61. <https://doi.org/10.1177/039463201402700202>.
- Maina, Ivy W., Alan D. Workman, et Noam A. Cohen. 2018. « The Role of Bitter and Sweet Taste Receptors in Upper Airway Innate Immunity: Recent Advances and Future Directions ». *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery* 4 (3): 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.wjorl.2018.07.003>.
- Maino, Alberto, Raffaella Rossio, Massimo Cugno, et al. 2012. « Hypereosinophilic Syndrome, Churg-Strauss Syndrome and Parasitic Diseases: Possible Links between Eosinophilia and Thrombosis ». *Current Vascular Pharmacology* 10 (5): 670-75. <https://doi.org/10.2174/157016112801784594>.
- Majidipur, Amene, Margot Morin-Dewaele, Jeanne Gaspar Lopes, et al. 2023. « Apalutamide Prevents SARS-CoV-2 Infection in Lung Epithelial Cells and in Human Nasal Epithelial Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (4): 3288. <https://doi.org/10.3390/ijms24043288>.
- Malinsky, Rafael Rossell, Fabiana C. P. Valera, Fransérgio Emílio Cavallari, et al. 2013. « Matrix Metalloproteinases and Their Impact on Sinusal Extension in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 270 (4): 1345-48. <https://doi.org/10.1007/s00405-012-2219-9>.
- Mancuso, Maria Elisa, Johnny N. Mahlangu, et Steven W. Pipe. 2021. « The Changing Treatment Landscape in Haemophilia: From Standard Half-Life Clotting Factor Concentrates to Gene Editing ». *Lancet (London, England)* 397 (10274): 630-40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32722-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32722-7).
- Mann, Kenneth G., Saulius Butenas, et Kathleen Brummel. 2003. « The Dynamics of Thrombin Formation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (1): 17-25. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000046238.23903.fc>.
- Marcant, P., P. Balayé, R. Merhi, et al. 2021. « Dupilumab-Associated Hypereosinophilia in Patients

- Treated for Moderate-to-Severe Atopic Dermatitis ». *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV* 35 (6): e394-96. <https://doi.org/10.1111/jdv.17177>.
- Martin, W. L., A. P. West, L. Gan, et P. J. Bjorkman. 2001. « Crystal Structure at 2.8 Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding ». *Molecular Cell* 7 (4): 867-77. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00230-1).
- Martini, E., et G. Noët. 1993. « The pitfalls of lymphocyte immunophenotyping during HIV infection ». *Annales De Biologie Clinique* 51 (7-8): 689-96.
- Martiniano, Stacey L., Jordana E. Hoppe, Scott D. Sagel, et Edith T. Zemanick. 2014. « Advances in the Diagnosis and Treatment of Cystic Fibrosis ». *Advances in Pediatrics* 61 (1): 225-43. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2014.03.002>.
- Martini, E., J. C. Verhoef, C. Cullander, et al. 1997. « Confocal Laser Scanning Microscopic Visualization of the Transport of Dextran after Nasal Administration to Rats: Effects of Absorption Enhancers ». *Pharmaceutical Research* 14 (5): 631-37. <https://doi.org/10.1023/a:1012109329631>.
- Masjedi, Ali, Farnaz Hajizadeh, Farzaneh Beigi Dargani, et al. 2021. « Oncostatin M: A Mysterious Cytokine in Cancers ». *International Immunopharmacology* 90 (janvier): 107158. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107158>.
- Matsuda, Akira, Nobuyuki Ebihara, Norihiko Yokoi, et al. 2010. « Functional Role of Thymic Stromal Lymphopoietin in Chronic Allergic Keratoconjunctivitis ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (1): 151-55. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4183>.
- Matsuwaki, Yoshinori, Tetsushi Ookushi, Daiya Asaka, et al. 2008. « Chronic Rhinosinusitis: Risk Factors for the Recurrence of Chronic Rhinosinusitis Based on 5-Year Follow-up after Endoscopic Sinus Surgery ». *International Archives of Allergy and Immunology* 146 Suppl 1: 77-81. <https://doi.org/10.1159/000126066>.
- Maxfield, Alice Z., Lukas D. Landegger, Christopher D. Brook, et al. 2018. « Periostin as a Biomarker for Nasal Polyps in Chronic Rhinosinusitis ». *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* 158 (1): 181-86. <https://doi.org/10.1177/0194599817737967>.
- McBrien, Claire N., et Andrew Menzies-Gow. 2017. « The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma ». *Frontiers in Medicine* 4: 93. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00093>.
- McCarthy, K. M., Y. Yoong, et N. E. Simister. 2000. « Bidirectional Transcytosis of IgG by the Rat Neonatal Fc Receptor Expressed in a Rat Kidney Cell Line: A System to Study Protein Transport across Epithelia ». *Journal of Cell Science* 113 ( Pt 7) (avril): 1277-85.
- Medesan, C., D. Matesoi, C. Radu, et al. 1997. « Delineation of the Amino Acid Residues Involved in Transcytosis and Catabolism of Mouse IgG1 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158 (5): 2211-17.
- Meltzer, Eli O., Daniel L. Hamilos, James A. Hadley, et al. 2006. « Rhinosinusitis: Developing Guidance for Clinical Trials ». *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* 135 (5 Suppl): S31-80. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2006.09.014>.
- Menzella, Francesco, Patrizia Ruggiero, Giulia Ghidoni, et al. 2020. « Anti-IL5 Therapies for Severe Eosinophilic Asthma: Literature Review and Practical Insights ». *Journal of Asthma and Allergy* 13: 301-13. <https://doi.org/10.2147/JAA.S258594>.
- Meunier, S., M. Trossaert, C. Berger, et al. 2009. « French guidelines. Long-term prophylaxis for severe haemophilia A and B children to prevent haemophilic arthropathy ». *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie* 16 (12): 1571-78. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2009.08.010>.
- Meunier, Sandrine, Hervé Chambost, Virginie Demiguel, et al. 2013. « Use of Clinical Practice Guidelines on Long-Term Prophylaxis in Severe Hemophilia in France: A Retrospective Audit ». *The Journal of Pediatrics* 162 (6): 1241-44, 1244.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.11.080>.
- MHEMO. 2017. « La Cohorte FranceCoag ». <https://mhemmo.fr/la-filiere-mhemmo/le-reseau-francecoag/la-cohorte-francecoag/>.
- Michael, A., J. J. Hackett, M. Bennett, et al. 1989. « Regulation of B Lymphocytes by Natural Killer Cells. Role of IFN-Gamma ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 142 (4): 1095-1101.
- Mihara, Masahiko, Misato Hashizume, Hiroto Yoshida, et al. 2012. « IL-6/IL-6 Receptor System and Its Role in Physiological and Pathological Conditions ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 122 (4): 143-59. <https://doi.org/10.1042/CS20110340>.
- Mock, B. A., M. Krall, C. A. Kozak, et al. 1990. « IL9 Maps to Mouse Chromosome 13 and Human Chromosome 5 ». *Immunogenetics* 31 (4): 265-70. <https://doi.org/10.1007/BF00204898>.
- Mokkink, Lidwine B., Caroline B. Terwee, Donald L. Patrick, et al. 2010. « The COSMIN Checklist for Assessing the Methodological Quality of Studies on Measurement Properties of Health Status Measurement Instruments: An International Delphi Study ». *Quality of Life Research* 19 (4): 539-49. <https://doi.org/10.1007/s11136-010-9606-8>.
- Molet, S., Q. Hamid, F. Davoine, et al. 2001. « IL-17 Is Increased in Asthmatic Airways and Induces Human Bronchial Fibroblasts to Produce Cytokines ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108 (3):

430-38. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.117929>.

Molfino, N. A., D. Gossage, R. Kolbeck, *et al.* 2012. « Molecular and Clinical Rationale for Therapeutic Targeting of Interleukin-5 and Its Receptor ». *Clinical and Experimental Allergy* 42 (5): 712-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03854.x>.

Möller, Winfried, Uwe Schuschnig, Peter Bartenstein, *et al.* 2014. « Drug Delivery to Paranasal Sinuses Using Pulsating Aerosols ». *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* 27 (4): 255-63. <https://doi.org/10.1089/jamp.2013.1071>.

Molofsky, Ari B., Adam K. Savage, et Richard M. Locksley. 2015. « Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation ». *Immunity* 42 (6): 1005-19. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.006>.

Morin-Dewaele, Margot, Sophie Bartier, François Berry, *et al.* 2022. « Desloratadine, an FDA-Approved Cationic Amphiphilic Drug, Inhibits SARS-CoV-2 Infection in Cell Culture and Primary Human Nasal Epithelial Cells by Blocking Viral Entry ». *Scientific Reports* 12 (1): 21053. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25399-5>.

Moro, Kazuyo, Taketo Yamada, Masanobu Tanabe, *et al.* 2010. « Innate Production of T(H)2 Cytokines by Adipose Tissue-Associated c-Kit(+)Sca-1(+) Lymphoid Cells ». *Nature* 463 (7280): 540-44. <https://doi.org/10.1038/nature08636>.

Morse, Justin C., Ping Li, Kim A. Ely, *et al.* 2019. « Chronic Rhinosinusitis in Elderly Patients Is Associated with an Exaggerated Neutrophilic Proinflammatory Response to Pathogenic Bacteria ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143 (3): 990-1002.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.056>.

Mortuaire, G., I. Gengler, M. Balden, *et al.* 2018. « Impact of Allergy on Phenotypic and Endotypic Profiles of Nasal Polyposis ». *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* 135 (3): 159-62. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2017.11.005>.

Mortuaire, G., I. Gengler, C. Carpentier, *et al.* 2020. « T Helper 2 Inflammatory Markers Are Associated with Recurrence in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps after Endoscopic Sinus Surgery ». *Rhinology* 58 (5): 444-50. <https://doi.org/10.4193/Rhin19.439>.

Mortuaire, G., X. Leroy, I. Gengler, *et al.* 2015. « Histopathological Classification of Refractory Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *Histology and Histopathology* 30 (12): 1447-54. <https://doi.org/10.14670/HH-11-632>.

Mosmann, Timothy R., Holly Cherwinski, Martha W. Bond, *et al.* 2005. « Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. 1986 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (1): 5-14.

Mou, Zhonglin, Jiahong Xia, Yenong Tan, *et al.* 2009. « Overexpression of Thymic Stromal Lymphopoietin in Allergic Rhinitis ». *Acta Oto-Laryngologica* 129 (3): 297-301. <https://doi.org/10.1080/00016480802225884>.

Mozaffarian, Afsaneh, Avery W. Brewer, Esther S. Trueblood, *et al.* 2008. « Mechanisms of Oncostatin M-Induced Pulmonary Inflammation and Fibrosis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (10): 7243-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7243>.

Murphy, James M., et Ian G. Young. 2006. « IL-3, IL-5, and GM-CSF Signaling: Crystal Structure of the Human Beta-Common Receptor ». *Vitamins and Hormones* 74: 1-30. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(06\)74001-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74001-8).

Nagarkar, Deepti R., Julie A. Poposki, Bruce K. Tan, *et al.* 2013. « Thymic Stromal Lymphopoietin Activity Is Increased in Nasal Polyps of Patients with Chronic Rhinosinusitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (3): 593-600.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.005>.

Nagata, Yoshiyuki, Shuichiro Maruoka, Yasuhiro Gon, *et al.* 2019. « Expression of IL-25, IL-33, and Thymic Stromal Lymphopoietin in Nasal Polyp Gland Duct Epithelium in Patients With Chronic Rhinosinusitis ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 33 (4): 378-87. <https://doi.org/10.1177/1945892419835333>.

Nair, Parameswaran, Sally Wenzel, Klaus F. Rabe, *et al.* 2017. « Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Benralizumab in Severe Asthma ». *The New England Journal of Medicine* 376 (25): 2448-58. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal703501>.

Nakagome, Kazuyuki, et Makoto Nagata. 2018. « Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation ». *Frontiers in Immunology* 9: 2220. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02220>.

Nakayama, T., M. Yoshikawa, D. Asaka, *et al.* 2011. « Mucosal Eosinophilia and Recurrence of Nasal Polyps - New Classification of Chronic Rhinosinusitis ». *Rhinology* 49 (4): 392-96. <https://doi.org/10.4193/Rhino10.261>.

Nederlof, Angelique, Steve Kitchen, Piet Meijer, *et al.* 2020. « Performance of Factor IX Extended Half-Life Product Measurements in External Quality Control Assessment Programs ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 18 (8): 1874-83. <https://doi.org/10.1111/jth.14847>.

Negrier, Claude, Karin Knobe, Andreas Tiede, *et al.* 2011. « Enhanced Pharmacokinetic Properties of a GlycoPEGylated Recombinant Factor IX: A First Human Dose Trial in Patients with Hemophilia B ». *Blood* 118 (10): 2695-2701. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-335596>.

- Neill, Daniel R., See Heng Wong, Agustin Bellosi, *et al.* 2010. « Nuocytes Represent a New Innate Effector Leukocyte That Mediates Type-2 Immunity ». *Nature* 464 (7293): 1367-70. <https://doi.org/10.1038/nature08900>.
- Nissim, A., et Y. Chernajovsky. 2008. « Historical Development of Monoclonal Antibody Therapeutics ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 181: 3-18. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_1).
- Nonaka, M., R. Nonaka, K. Woolley, *et al.* 1995. « Distinct Immunohistochemical Localization of IL-4 in Human Inflamed Airway Tissues. IL-4 Is Localized to Eosinophils *in vivo* and Is Released by Peripheral Blood Eosinophils ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 155 (6): 3234-44.
- Noone, D., B. O'Mahony, J. P. van Dijk, et L. Prihodova. 2013. « A Survey of the Outcome of Prophylaxis, on-Demand Treatment or Combined Treatment in 18-35-Year Old Men with Severe Haemophilia in Six Countries ». *Haemophilia* 19 (1): 44-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02934.x>.
- Noone, Peadar G., Margaret W. Leigh, Aruna Sannuti, *et al.* 2004. « Primary Ciliary Dyskinesia: Diagnostic and Phenotypic Features ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169 (4): 459-67. <https://doi.org/10.1164/rccm.200303-365OC>.
- Norlander, T., K. M. Westrin, M. Fukami, *et al.* 1996. « Experimentally Induced Polyps in the Sinus Mucosa: A Structural Analysis of the Initial Stages ». *The Laryngoscope* 106 (2 Pt 1): 196-203. <https://doi.org/10.1097/00005537-199602000-00017>.
- Nowak, Elizabeth C., Casey T. Weaver, Henrietta Turner, *et al.* 2009. « IL-9 as a Mediator of Th17-Driven Inflammatory Disease ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (8): 1653-60. <https://doi.org/10.1084/jem.20090246>.
- Ober, R. J., C. G. Radu, V. Ghetie, et E. S. Ward. 2001. « Differences in Promiscuity for Antibody-FcRn Interactions across Species: Implications for Therapeutic Antibodies ». *International Immunology* 13 (12): 1551-59. <https://doi.org/10.1093/intimm/13.12.1551>.
- Oganesyan, Vaheh, Melissa M. Damschroder, Kimberly E. Cook, *et al.* 2014. « Structural Insights into Neonatal Fc Receptor-Based Recycling Mechanisms ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (11): 7812-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.537563>.
- Oh, Chad K., Richard Leigh, Kimmie K. McLaurin, *et al.* 2013. « A Randomized, Controlled Trial to Evaluate the Effect of an Anti-Interleukin-9 Monoclonal Antibody in Adults with Uncontrolled Asthma ». *Respiratory Research* 14 (1): 93. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-93>.
- Oh, Chad K., Donald Raible, Gregory P. Geba, et Nestor A. Molfino. 2011. « Biology of the Interleukin-9 Pathway and Its Therapeutic Potential for the Treatment of Asthma ». *Inflammation & Allergy Drug Targets* 10 (3): 180-86. <https://doi.org/10.2174/187152811795564073>.
- Ohto-Ozaki, Hiromi, Kenji Kuroiwa, Naoko Mato, *et al.* 2010. « Characterization of ST2 Transgenic Mice with Resistance to IL-33 ». *European Journal of Immunology* 40 (9): 2632-42. <https://doi.org/10.1002/eji.200940291>.
- Ordovas-Montanes, Jose, Daniel F. Dwyer, Sarah K. Nyquist, *et al.* 2018. « Allergic Inflammatory Memory in Human Respiratory Epithelial Progenitor Cells ». *Nature* 560 (7720): 649-54. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0449-8>.
- Ortega, Hector G., Steven W. Yancey, Bhabita Mayer, *et al.* 2016. « Severe Eosinophilic Asthma Treated with Mepolizumab Stratified by Baseline Eosinophil Thresholds: A Secondary Analysis of the DREAM and MENSA Studies ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 4 (7): 549-56. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30031-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30031-5).
- O'Shea, John J., et William E. Paul. 2010. « Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5969): 1098-1102. <https://doi.org/10.1126/science.1178334>.
- Ouyang, Yuhui, Erzhong Fan, Ying Li, *et al.* 2013. « Clinical Characteristics and Expression of Thymic Stromal Lymphopoietin in Eosinophilic and Non-Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis ». *ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties* 75 (1): 37-45. <https://doi.org/10.1159/000346929>.
- Oyer, Samuel L., Jennifer K. Mulligan, Alkis J. Psaltis, *et al.* 2013. « Cytokine Correlation between Sinus Tissue and Nasal Secretions among Chronic Rhinosinusitis and Controls ». *The Laryngoscope* 123 (12): E72-78. <https://doi.org/10.1002/lary.24305>.
- Oyer, Samuel L., Whitney Nagel, et Jennifer K. Mulligan. 2013. « Differential Expression of Adhesion Molecules by Sinonasal Fibroblasts among Control and Chronic Rhinosinusitis Patients ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 27 (5): 381-86. <https://doi.org/10.2500/ajra.2013.27.3934>.
- Palmer, Charlie, Jennifer K. Mulligan, Sarah E. Smith, et Carl Atkinson. 2017. « The Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Upper Airway Inflammation ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 31 (6): 345-51. <https://doi.org/10.2500/ajra.2017.31.4472>.
- Pandey, A., K. Ozaki, H. Baumann, *et al.* 2000. « Cloning of a Receptor Subunit Required for Signaling by Thymic Stromal Lymphopoietin ». *Nature Immunology* 1 (1): 59-64. <https://doi.org/10.1038/76923>.
- Pankratz, Susann, Stefan Bittner, Beate E. Kehrel, *et al.* 2016. « The Inflammatory Role of Platelets:

Translational Insights from Experimental Studies of Autoimmune Disorders ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (10): 1723. <https://doi.org/10.3390/ijms17101723>.

Pant, Harshita, et Peta Macardle. 2014. « CD8(+) T Cells Implicated in the Pathogenesis of Allergic Fungal Rhinosinusitis ». *Allergy & Rhinology (Providence, R.I.)* 5 (3): 146-56. <https://doi.org/10.2500/ar.2014.5.0103>.

Papon, Jean-François, Laurence Bassinet, Gwenaëlle Cariou-Patron, et al. 2012. « Quantitative Analysis of Ciliary Beating in Primary Ciliary Dyskinesia: A Pilot Study ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7 (octobre): 78. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-78>.

Papon, Jean-François, André Coste, Marie-Claude Gendron, et al. 2002. « HLA-DR and ICAM-1 Expression and Modulation in Epithelial Cells from Nasal Polyps ». *The Laryngoscope* 112 (11): 2067-75. <https://doi.org/10.1097/00005537-200211000-00030>.

Park, L. S., U. Martin, K. Garka, et al. 2000. « Cloning of the Murine Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) Receptor: Formation of a Functional Heteromeric Complex Requires Interleukin 7 Receptor ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (5): 659-70. <https://doi.org/10.1084/jem.192.5.659>.

Passali, D., R. Ferri, G. Becchini, et al. 1999. « Alterations of Nasal Mucociliary Transport in Patients with Hypertrophy of the Inferior Turbinates, Deviations of the Nasal Septum and Chronic Sinusitis ». *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 256 (7): 335-37. <https://doi.org/10.1007/s004050050158>.

Patou, Joke, Gabriele Holtappels, Karen Affleck, et al. 2011. « Syk-Kinase Inhibition Prevents Mast Cell Activation in Nasal Polyps ». *Rhinology* 49 (1): 100-106. <https://doi.org/10.4193/Rhino09.147>.

Pawankar, R. 2001. « Mast Cells as Orchestrators of the Allergic Reaction: The IgE-IgE Receptor Mast Cell Network ». *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 1 (1): 3-6. <https://doi.org/10.1097/01.all.0000010977.11360.f4>.

Pawankar, Ruby, Kun Hee Lee, Manabu Nonaka, et Ryuta Takizawa. 2007. « Role of Mast Cells and Basophils in Chronic Rhinosinusitis ». *Clinical Allergy and Immunology* 20: 93-101.

Pelaia, Corrado, Giovanni Paoletti, Francesca Puggioni, et al. 2019. « Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma ». *Frontiers in Physiology* 10: 1514. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01514>.

Pelaia, Girolamo, Alessandro Vatrella, Maria Teresa Busceti, et al. 2016. « Role of Biologics in Severe Eosinophilic Asthma - Focus on Reslizumab ». *Therapeutics and Clinical Risk Management* 12: 1075-82. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S111862>.

Perić, Aleksandar, Nenad Baletić, Jelena Sotirović, et Cveta Špadijer-Mirković. 2015. « Macrophage Inflammatory Protein-1 Production and Eosinophil Infiltration in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology* 124 (4): 266-72. <https://doi.org/10.1177/0003489414554944>.

Perot, Eloïse, Nathalie Enjolras, Sandra Le Quellec, et al. 2015. « Expression and Characterization of a Novel Human Recombinant Factor IX Molecule with Enhanced *in vitro* and *in vivo* Clotting Activity ». *Thrombosis Research* 135 (5): 1017-24. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.02.034>.

Peters, Anju T., Atsushi Kato, Ning Zhang, David B. Conley, Lydia Suh, Brian Tancowny, Derek Carter, et al. 2010. « Evidence for Altered Activity of the IL-6 Pathway in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2): 397-403.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.072>.

Peters, Robert T., Susan C. Low, George D. Kamphaus, et al. 2010. « Prolonged Activity of Factor IX as a Monomeric Fc Fusion Protein ». *Blood* 115 (10): 2057-64. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239665>.

Peterson, Sarah, Julie A. Poposki, Deepti R. Nagarkar, et al. 2012. « Increased Expression of CC Chemokine Ligand 18 in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (1): 119-127.e1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.08.021>.

Petkova, Stefka B., Shreeram Akilesh, Thomas J. Sproule, et al. 2006. « Enhanced Half-Life of Genetically Engineered Human IgG1 Antibodies in a Humanized FcRn Mouse Model: Potential Application in Humorally Mediated Autoimmune Disease ». *International Immunology* 18 (12): 1759-69. <https://doi.org/10.1093/intimm/dx1110>.

Peyvandí, Flora, Pier M. Mannucci, Isabella Garagiola, et al. 2016. « A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A ». *The New England Journal of Medicine* 374 (21): 2054-64. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516437>.

Pfeffer, Paul E., Nasloon Ali, Ruth Murray, et al. 2023. « Comparative Effectiveness of Anti-IL5 and Anti-IgE Biologic Classes in Patients with Severe Asthma Eligible for Both ». *Allergy*, mars. <https://doi.org/10.1111/all.15711>.

Philpott, Carl M., Sally Erskine, Claire Hopkins, et al. 2018. « Prevalence of Asthma, Aspirin Sensitivity and Allergy in Chronic Rhinosinusitis: Data from the UK National Chronic Rhinosinusitis Epidemiology Study ». *Respiratory Research* 19 (1): 129. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0823-y>.

Piccirillo, Jay F., Michael G. Merritt, et Michele L. Richards. 2002. « Psychometric and Clinimetric Validity of the 20-Item Sino-Nasal Outcome Test (SNOT-20) ». *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* 126 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1067/mhn.2002.121022>.

- Pilette, Charles, Youssef Ouadrhiri, Jacques Van Snick, *et al.* 2002. « IL-9 Inhibits Oxidative Burst and TNF-Alpha Release in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes through TGF-Beta ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (8): 4103-11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.4103>.
- Piliponsky, Adrian M., et Luigina Romani. 2018. « The Contribution of Mast Cells to Bacterial and Fungal Infection Immunity ». *Immunological Reviews* 282 (1): 188-97. <https://doi.org/10.1111/imr.12623>.
- Platokouki, H., K. Fischer, S. C. Gouw, *et al.* 2018. « Vaccinations Are Not Associated with Inhibitor Development in Boys with Severe Haemophilia A ». *Haemophilia* 24 (2): 283-90. <https://doi.org/10.1111/hae.13387>.
- Poole, Alex, Cydney Urbanek, Celeste Eng, *et al.* 2014. « Dissecting Childhood Asthma with Nasal Transcriptomics Distinguishes Subphenotypes of Disease ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (3): 670-678.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.025>.
- Poposki, Julie A., Ashraf Uzzaman, Deepti R. Nagarkar, *et al.* 2011. « Increased Expression of the Chemokine CCL23 in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (1): 73-81.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.017>.
- Pothoven, Kathryn L., James E. Norton, Kathryn E. Hulse, *et al.* 2015. « Oncostatin M Promotes Mucosal Epithelial Barrier Dysfunction, and Its Expression Is Increased in Patients with Eosinophilic Mucosal Disease ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136 (3): 737-746.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.043>.
- Pothoven, Kathryn L., James E. Norton, Lydia A. Suh, *et al.* 2017. « Neutrophils Are a Major Source of the Epithelial Barrier Disrupting Cytokine Oncostatin M in Patients with Mucosal Airways Disease ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (6): 1966-1978.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.10.039>.
- Poupard, Claire, Emmanuelle Jeanpierre, Dominique Lasne, *et al.* 2019. « Factor IX assays in treated hemophilia B patients ». *Annales De Biologie Clinique* 77 (1): 41-52. <https://doi.org/10.1684/abc.2019.1414>.
- Powell, Jerry S., K. John Pasi, Margaret V. Ragni, *et al.* 2013. « Phase 3 Study of Recombinant Factor IX Fc Fusion Protein in Hemophilia B ». *The New England Journal of Medicine* 369 (24): 2313-23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal305074>.
- Praetor, Asja, Robert M. Jones, Woei Ling Wong, et Walter Hunziker. 2002. « Membrane-Anchored Human FcRn Can Oligomerize in the Absence of IgG ». *Journal of Molecular Biology* 321 (2): 277-84. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00626-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00626-5).
- Presnell, Steven R., et Darrel W. Stafford. 2002. « The Vitamin K-Dependent Carboxylase ». *Thrombosis and Haemostasis* 87 (6): 937-46.
- Proetzel, Gabriele, Michael V. Wiles, et Derry C. Roopenian. 2014. « Genetically Engineered Humanized Mouse Models for Preclinical Antibody Studies ». *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 28 (2): 171-80. <https://doi.org/10.1007/s40259-013-0071-0>.
- Prulière-Escabasse, Virginie, Christine Clerici, Grégoire Vuagniaux, *et al.* 2010. « Effect of Neutrophil Elastase and Its Inhibitor EPI-HNE4 on Transepithelial Sodium Transport across Normal and Cystic Fibrosis Human Nasal Epithelial Cells ». *Respiratory Research* 11 (1): 141. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-141>.
- Prulière-Escabasse, Virginie, Pascale Fanen, Anne Catherine Dazy, *et al.* 2005. « TGF-Beta 1 Downregulates CFTR Expression and Function in Nasal Polyps of Non-CF Patients ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 288 (1): L77-83. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00048.2004>.
- Prulière-Escabasse, Virginie, Carole Planès, Estelle Escudier, *et al.* 2007. « Modulation of Epithelial Sodium Channel Trafficking and Function by Sodium 4-Phenylbutyrate in Human Nasal Epithelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (47): 34048-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702384200>.
- Putheti, Prabhakar, Amit Awasthi, Joyce Popoola, *et al.* 2010. « Human CD4 Memory T Cells Can Become CD4+IL-9+ T Cells ». *PloS One* 5 (1): e8706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008706>.
- Quentmeier, H., H. G. Drexler, D. Fleckenstein, *et al.* 2001. « Cloning of Human Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) and Signaling Mechanisms Leading to Proliferation ». *Leukemia* 15 (8): 1286-92. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402175>.
- Rabeony, Hanitriniaina, Isabelle Petit-Paris, Julien Garnier, *et al.* 2014. « Inhibition of Keratinocyte Differentiation by the Synergistic Effect of IL-17A, IL-22, IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  and Oncostatin M ». *PloS One* 9 (7): e101937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101937>.
- Rael, Efrén L., et Richard F. Lockey. 2011. « Interleukin-13 Signaling and Its Role in Asthma ». *The World Allergy Organization Journal* 4 (3): 54-64. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e31821188e0>.
- Raghavan, M., V. R. Bonagura, S. L. Morrison, et 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): 14649-57. <https://doi.org/10.1021/bi00045a005>.
- Ramalingam, Thirumalai R., John T. Pesce, Faruk Sheikh, *et al.* 2008. « Unique Functions of the Type II Interleukin 4 Receptor Identified in Mice Lacking the Interleukin 13 Receptor Alpha Chain ». *Nature Immunology* 9 (1): 25-33. <https://doi.org/10.1038/ni1544>.
- Ramirez, Giuseppe A., Mona-Rita Yacoub, Marco Ripa, *et al.* 2018. « Eosinophils from Physiology to

- Disease: A Comprehensive Review ». *BioMed Research International* 2018: 9095275. <https://doi.org/10.1155/2018/9095275>.
- Rath, Timo, Timothy T. Kuo, Kristi Baker, *et al.* 2013. « The Immunologic Functions of the Neonatal Fc Receptor for IgG ». *Journal of Clinical Immunology* 33 Suppl 1 (janvier): S9-17. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9768-y>.
- Rawool, Deepak B., Constantine Bitsaktis, Ying Li, *et al.* 2008. « Utilization of Fc Receptors as a Mucosal Vaccine Strategy against an Intracellular Bacterium, Francisella Tularensis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (8): 5548-57. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5548>.
- Reader, J. Rachel, Dallas M. Hyde, Edward S. Schelegle, *et al.* 2003. « Interleukin-9 Induces Mucous Cell Metaplasia Independent of Inflammation ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 28 (6): 664-72. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0207OC>.
- Reche, P. A., V. Soumelis, D. M. Gorman, *et al.* 2001. « Human Thymic Stromal Lymphopoietin Preferentially Stimulates Myeloid Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (1): 336-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.336>.
- Reddel, Helen K., Eric D. Bateman, Allan Becker, *et al.* 2015. « A Summary of the New GINA Strategy: A Roadmap to Asthma Control ». *The European Respiratory Journal* 46 (3): 622-39. <https://doi.org/10.1183/13993003.00853-2015>.
- Reiman, Rachael M., Robert W. Thompson, Carl G. Feng, *et al.* 2006. « Interleukin-5 (IL-5) Augments the Progression of Liver Fibrosis by Regulating IL-13 Activity ». *Infection and Immunity* 74 (3): 1471-79. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1471-1479.2006>.
- Renauld, J. C., C. Druez, A. Kermouni, *et al.* 1992. « Expression Cloning of the Murine and Human Interleukin 9 Receptor cDNAs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (12): 5690-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5690>.
- Rennard, S. I. 1999. « Inflammation and Repair Processes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160 (5 Pt 2): S12-16. [https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.supplement\\_1.5](https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.supplement_1.5).
- Richards, Carl D. 2013. « The Enigmatic Cytokine Oncostatin m and Roles in Disease ». *ISRN Inflammation* 2013 (décembre): 512103. <https://doi.org/10.1155/2013/512103>.
- Richards, Carl D., Laura Izakelian, Anisha Dubey, *et al.* 2016. « Regulation of IL-33 by Oncostatin M in Mouse Lung Epithelial Cells ». *Mediators of Inflammation* 2016: 9858374. <https://doi.org/10.1155/2016/9858374>.
- Rodewald, R., et D. R. Abrahamson. 1982. « Receptor-Mediated Transport of IgG across the Intestinal Epithelium of the Neonatal Rat ». *Ciba Foundation Symposium*, n° 92: 209-32. <https://doi.org/10.1002/9780470720745.ch11>.
- Rodewald, R., et J. P. Kraehenbuhl. 1984. « Receptor-Mediated Transport of IgG ». *The Journal of Cell Biology* 99 (1 Pt 2): 159s-64. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.1.159s>.
- Roopenian, Derry C., et Shreeram Akilesh. 2007. « FcRn: The Neonatal Fc Receptor Comes of Age ». *Nature Reviews. Immunology* 7 (9): 715-25. <https://doi.org/10.1038/nri2155>.
- Roopenian, Derry C., Gregory J. Christianson, et Thomas J. Sproule. 2010. « Human FcRn Transgenic Mice for Pharmacokinetic Evaluation of Therapeutic Antibodies ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 602: 93-104. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-058-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-058-8_6).
- Roopenian, Derry C., Gregory J. Christianson, Thomas J. Sproule, *et al.* 2003. « The MHC Class I-like IgG Receptor Controls Perinatal IgG Transport, IgG Homeostasis, and Fate of IgG-Fc-Coupled Drugs ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170 (7): 3528-33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.7.3528>.
- Roopenian, Derry C., et Victor Z. Sun. 2010. « Clinical Ramifications of the MHC Family Fc Receptor FcRn ». *Journal of Clinical Immunology* 30 (6): 790-97. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9458-6>.
- Rosati, Davide, Chiara Rosato, Giulio Pagliuca, *et al.* 2020. « Predictive Markers of Long-Term Recurrence in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *American Journal of Otolaryngology* 41 (1): 102286. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2019.102286>.
- Rose-John, S., et P. C. Heinrich. 1994. « Soluble Receptors for Cytokines and Growth Factors: Generation and Biological Function ». *The Biochemical Journal* 300 ( Pt 2) (Pt 2): 281-90. <https://doi.org/10.1042/bj3000281>.
- Rose-John, Stefan. 2018. « Interleukin-6 Family Cytokines ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (2): a028415. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>.
- Rosenberg, Helene F., Kimberly D. Dyer, et Paul S. Foster. 2013. « Eosinophils: Changing Perspectives in Health and Disease ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (1): 9-22. <https://doi.org/10.1038/nri3341>.
- Rossjohn, J., W. J. McKinstry, J. M. Woodcock, *et al.* 2000. « Structure of the Activation Domain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 Receptor Common Beta-Chain Bound to an Antagonist ». *Blood* 95 (8): 2491-98.
- Rudack, C., M. Steinhoff, F. Mooren, *et al.* 2007. « PAR-2 Activation Regulates IL-8 and GRO-Alpha Synthesis by NF-KappaB, but Not RANTES, IL-6, Eotaxin or TARC Expression in Nasal Epithelium ». *Clinical and Experimental Allergy* 37 (7): 1009-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02686.x>.
- Rudack, C., W. Stoll, et C. Bachert. 1998. « Cytokines in Nasal Polyposis, Acute and Chronic Sinusitis ».

*American Journal of Rhinology* 12 (6): 383-88. <https://doi.org/10.2500/105065898780708008>.

Russell, S. M., J. A. Johnston, M. Noguchi, *et al.* 1994. « Interaction of IL-2R Beta and Gamma c Chains with Jak1 and Jak3: Implications for XSCID and XCID ». *Science (New York, N.Y.)* 266 (5187): 1042-45. <https://doi.org/10.1126/science.7973658>.

Saenz, Steven A., Mark C. Siracusa, Jacqueline G. Perrigoue, *et al.* 2010. « IL25 Elicits a Multipotent Progenitor Cell Population That Promotes T(H)2 Cytokine Responses ». *Nature* 464 (7293): 1362-66. <https://doi.org/10.1038/nature08901>.

Sahlstrand-Johnson, P., B. Ohlsson, C. Von Buchwald, *et al.* 2011. « A Multi-Centre Study on Quality of Life and Absenteeism in Patients with CRS Referred for Endoscopic Surgery ». *Rhinology* 49 (4): 420-28. <https://doi.org/10.4193/Rhino11.101>.

Sakuma, Yasunori, Junichi Ishitoya, Masanori Komatsu, *et al.* 2011. « New Clinical Diagnostic Criteria for Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis ». *Auris, Nasus, Larynx* 38 (5): 583-88. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2011.01.007>.

Salathe, Matthias. 2007. « Regulation of Mammalian Ciliary Beating ». *Annual Review of Physiology* 69: 401-22. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141253>.

Sallusto, Federica. 2016. « Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes ». *Annual Review of Immunology* 34 (mai): 317-34. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112056>.

Samson, Géraldine, Alicia García de la Calera, Sophie Dupuis-Girod, *et al.* 2012. « Ex vivo Study of Bevacizumab Transport through Porcine Nasal Mucosa ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80 (2): 465-69. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.11.004>.

Scaffidi, Amelia K., Steven E. Mutsaers, Yuben P. Moodley, Robin J. McAnulty, Geoffrey J. Laurent, Philip J. Thompson, et Darryl A. Knight. 2002. « Oncostatin M Stimulates Proliferation, Induces Collagen Production and Inhibits Apoptosis of Human Lung Fibroblasts ». *British Journal of Pharmacology* 136 (5): 793-801. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704769>.

Schäffer, Michael, Wiebke Weimer, Susanne Wider, *et al.* 2002. « Differential Expression of Inflammatory Mediators in Radiation-Impaired Wound Healing ». *The Journal of Surgical Research* 107 (1): 93-100.

Schmitt, E., T. Germann, S. Goedert, *et al.* 1994. « IL-9 Production of Naive CD4+ T Cells Depends on IL-2, Is Synergistically Enhanced by a Combination of TGF-Beta and IL-4, and Is Inhibited by IFN-Gamma ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153 (9): 3989-96.

Schmitt, E., R. Van Brandwijk, J. Van Snick, *et al.* 1989. « TCGF III/P40 Is Produced by Naive Murine CD4+ T Cells but Is Not a General T Cell Growth Factor ». *European Journal of Immunology* 19 (11): 2167-70. <https://doi.org/10.1002/eji.1830191130>.

Schmitz, Jochen, Alexander Owyang, Elizabeth Oldham, Yaoli Song, Erin Murphy, Terril K. McClanahan, Gerard Zurawski, *et al.* 2005. « IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine That Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines ». *Immunity* 23 (5): 479-90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.015>.

Schulte, Stefan. 2009. « Half-Life Extension through Albumin Fusion Technologies ». *Thrombosis Research* 124 Suppl 2 (décembre): S6-8. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(09\)70157-4](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(09)70157-4).

Schwaab, R., H. H. Brackmann, C. Meyer, J. Seehafer, *et al.* 1995. « Haemophilia A: Mutation Type Determines Risk of Inhibitor Formation ». *Thrombosis and Haemostasis* 74 (6): 1402-6.

Semienchuk, Mitch. 2022. « Report on the Annual Global Survey 2021 Now Available ». *WFH - World Federation of Hemophilia* (blog). 7 décembre 2022. <https://wfh.org/article/report-on-the-annual-global-survey-2021-now-available/>.

Sesé, L., G. Mahay, C. Barnig, *et al.* 2022. « Markers of severity and predictors of response to treatment in severe asthma ». *Revue Des Maladies Respiratoires* 39 (9): 740-57. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2022.08.009>.

Shapiro, Amy D., Margaret V. Ragni, Leonard A. Valentino, *et al.* 2012. « Recombinant Factor IX-Fc Fusion Protein (RFIXFc) Demonstrates Safety and Prolonged Activity in a Phase 1/2a Study in Hemophilia B Patients ». *Blood* 119 (3): 666-72. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-367003>.

Shi, L.-L., P. Xiong, L. Zhang, *et al.* 2013. « Features of Airway Remodeling in Different Types of Chinese Chronic Rhinosinusitis Are Associated with Inflammation Patterns ». *Allergy* 68 (1): 101-9. <https://doi.org/10.1111/all.12064>.

Shi, Y., S. J. Ullrich, J. Zhang, *et al.* 2000. « A Novel Cytokine Receptor-Ligand Pair. Identification, Molecular Characterization, and *in vivo* Immunomodulatory Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (25): 19167-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910228199>.

Shields, R. L., A. K. Namenuk, K. Hong, *et al.* 2001. « High Resolution Mapping of the Binding Site on Human IgG1 for Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, and FcRn and Design of IgG1 Variants with Improved Binding to the Fc Gamma R ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (9): 6591-6604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009483200>.

Shikhagaie, Medya M., Kristine Germar, Suzanne M. Bal, *et al.* 2017. « Innate Lymphoid Cells in

- Autoimmunity: Emerging Regulators in Rheumatic Diseases ». *Nature Reviews. Rheumatology* 13 (3): 164-73. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.218>.
- Shimbara, A., P. Christodouloupoulos, A. Soussi-Gounni, *et al.* 2000. « IL-9 and Its Receptor in Allergic and Nonallergic Lung Disease: Increased Expression in Asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105 (1 Pt 1): 108-15. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(00\)90185-4](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(00)90185-4).
- Shimizu, Shino, Hideaki Kouzaki, Tomohisa Kato, *et al.* 2016. « HMGB1-TLR4 Signaling Contributes to the Secretion of Interleukin 6 and Interleukin 8 by Nasal Epithelial Cells ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 30 (3): 167-72. <https://doi.org/10.2500/ajra.2016.30.4300>.
- Shin, Hyun-Woo, Dong-Kyu Kim, Min-Hyun Park, *et al.* 2015. « IL-25 as a Novel Therapeutic Target in Nasal Polyps of Patients with Chronic Rhinosinusitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (6): 1476-1485.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.003>.
- Shin, Seung Heon, Yee Hyuk Kim, Hyo Sung Jin, et Seung Hyun Kang. 2016. « Alternaria Induces Production of Thymic Stromal Lymphopoietin in Nasal Fibroblasts Through Toll-like Receptor 2 ». *Allergy, Asthma & Immunology Research* 8 (1): 63-68. <https://doi.org/10.4168/aaair.2016.8.1.63>.
- Shin, Seung-Heon, Mi-Kyung Ye, Yee-Hyuk Kim, et Jeong-Kyu Kim. 2016. « Role of TLRs in the Production of Chemical Mediators in Nasal Polyp Fibroblasts by Fungi ». *Auris, Nasus, Larynx* 43 (2): 166-70. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2015.07.003>.
- Shiono, Osamu, Yasunori Sakuma, Masanori Komatsu, *et al.* 2015. « Differential Expression of Periostin in the Nasal Polyp May Represent Distinct Histological Features of Chronic Rhinosinusitis ». *Auris, Nasus, Larynx* 42 (2): 123-27. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2014.09.003>.
- Simister, N. E., et K. E. Mostov. 1989. « An Fc Receptor Structurally Related to MHC Class I Antigens ». *Nature* 337 (6203): 184-87. <https://doi.org/10.1038/337184a0>.
- Simister, N. E., et A. R. Rees. 1985. « Isolation and Characterization of an Fc Receptor from Neonatal Rat Small Intestine ». *European Journal of Immunology* 15 (7): 733-38. <https://doi.org/10.1002/eji.1830150718>.
- Simpson, Mindy L., et Leonard A. Valentino. 2012. « Management of Joint Bleeding in Hemophilia ». *Expert Review of Hematology* 5 (4): 459-68. <https://doi.org/10.1586/ehm.12.27>.
- Slater, A., L. A. Smallman, A. C. Logan, et A. B. Drake-Lee. 1996. « Mucociliary Function in Patients with Nasal Polyps ». *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* 21 (4): 343-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2273.1996.tb01084.x>.
- Snelgrove, Robert J. 2011. « Leukotriene A4 Hydrolase: An Anti-Inflammatory Role for a Proinflammatory Enzyme ». *Thorax* 66 (6): 550-51. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200234>.
- Snelgrove, Robert J., Patricia L. Jackson, Matthew T. Hardison, *et al.* 2010. « A Critical Role for LTA4H in Limiting Chronic Pulmonary Neutrophilic Inflammation ». *Science (New York, N.Y.)* 330 (6000): 90-94. <https://doi.org/10.1126/science.1190594>.
- Sokolosky, Jonathan T., et Francis C. Szoka. 2015. « The Neonatal Fc Receptor, FcRn, as a Target for Drug Delivery and Therapy ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 91 (août): 109-24. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.005>.
- Sokoya, Mofiyinfolu, Vijay R. Ramakrishnan, Daniel N. Frank, *et al.* 2017. « Expression of Immunoglobulin D Is Increased in Chronic Rhinosinusitis ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 119 (4): 317-323.e1. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.07.024>.
- Soler, Zachary M., David A. Sauer, Jess Mace, et Timothy L. Smith. 2009. « Relationship between Clinical Measures and Histopathologic Findings in Chronic Rhinosinusitis ». *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 141 (4): 454-61. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2009.06.085>.
- Sonaje, Kiran, Er-Yuan Chuang, Kun-Ju Lin, *et al.* 2012. « Opening of Epithelial Tight Junctions and Enhancement of Paracellular Permeation by Chitosan: Microscopic, Ultrastructural, and Computed-Tomographic Observations ». *Molecular Pharmaceutics* 9 (5): 1271-79. <https://doi.org/10.1021/mp200572t>.
- Wei Yuan, Gina Edward, Bernhart Homey, Michel Gilliet, *et al.* 2002. « Human Epithelial Cells Trigger Dendritic Cell Mediated Allergic Inflammation by Producing TSLP ». *Nature Immunology* 3 (7): 673-80. <https://doi.org/10.1038/ni805>.
- Soyka, Michael B., Fabio S. Ryser, Catrin Brühlmann, *et al.* 2023. « Predicting Dupilumab Treatment Outcome in Patients with Primary Diffuse Type 2 Chronic Rhinosinusitis ». *Allergy* 78 (4): 1036-46. <https://doi.org/10.1111/all.15532>.
- Soyka, Michael B., Paulina Wawrzyniak, Thomas Eiwegger, *et al.* 2012. « Defective Epithelial Barrier in Chronic Rhinosinusitis: The Regulation of Tight Junctions by IFN- $\gamma$  and IL-4 ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (5): 1087-1096.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.052>.
- Spiekermann, Gerburg M., Patricia W. Finn, E. Sally Ward, *et al.* 2002. « Receptor-Mediated Immunoglobulin G Transport across Mucosal Barriers in Adult Life: Functional Expression of FcRn in the Mammalian Lung ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (3): 303-10. <https://doi.org/10.1084/jem.20020400>.

- Spindler, Lena Marie, Andreas Feuerhake, Simone Ladel, *et al.* 2021. « Nano-in-Micro-Particles Consisting of PLGA Nanoparticles Embedded in Chitosan Microparticles via Spray-Drying Enhances Their Uptake in the Olfactory Mucosa ». *Frontiers in Pharmacology* 12: 732954. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.732954>.
- Srivastava, A., A. K. Brewer, E. P. Mauser-Bunschoten, *et al.* 2013. « Guidelines for the Management of Hemophilia ». *Haemophilia* 19 (1): e1-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x>.
- Stannard, Wendy, Andrew Rutman, Colin Wallis, et Chris O'Callaghan. 2004. « Central Microtubular Agenesis Causing Primary Ciliary Dyskinesia ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169 (5): 634-37. <https://doi.org/10.1164/rccm.200306-782OC>.
- Steenwinckel, Valérie, Jamila Louahed, Muriel M. Lemaire, *et al.* 2009. « IL-9 Promotes IL-13-Dependent Paneth Cell Hyperplasia and up-Regulation of Innate Immunity Mediators in Intestinal Mucosa ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (8): 4737-43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801941>.
- Steenwinckel, Valérie, Jamila Louahed, Ciriana Orabona, *et al.* 2007. « IL-13 Mediates *in vivo* IL-9 Activities on Lung Epithelial Cells but Not on Hematopoietic Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (5): 3244-51. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.3244>.
- Stephens, Jacqueline M., et Carrie M. Elks. 2017. « Oncostatin M: Potential Implications for Malignancy and Metabolism ». *Current Pharmaceutical Design* 23 (25): 3645-57. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170704122559>.
- Stevens, Whitney W., Anju T. Peters, Bruce K. Tan, *et al.* 2019. « Associations Between Inflammatory Endotypes and Clinical Presentations in Chronic Rhinosinusitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice* 7 (8): 2812-2820.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.05.009>.
- Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, et D. A. Goodenough. 1986. « Identification of ZO-1: A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia ». *The Journal of Cell Biology* 103 (3): 755-66. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.3.755>.
- Stone, Kelly D., Calman Prussin, et Dean D. Metcalfe. 2010. « IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2): S73-80. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017>.
- Storm van's Gravesande, Karin, et Heymut Omran. 2005. « Primary Ciliary Dyskinesia: Clinical Presentation, Diagnosis and Genetics ». *Annals of Medicine* 37 (6): 439-49. <https://doi.org/10.1080/07853890510011985>.
- Sun, Yan, Bing Zhou, Chengshuo Wang, Qian Huang, *et al.* 2012. « Biofilm Formation and Toll-like Receptor 2, Toll-like Receptor 4, and NF-KappaB Expression in Sinus Tissues of Patients with Chronic Rhinosinusitis ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 26 (2): 104-9. <https://doi.org/10.2500/ajra.2012.26.3718>.
- Takabayashi, Tetsuji, Atsushi Kato, Anju T. Peters, *et al.* 2013. « Increased Expression of Factor XIII-A in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (3): 584-592.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.003>.
- Takabayashi, Tetsuji, Atsushi Kato, Anju T. Peters, *et al.* 2012. « Glandular Mast Cells with Distinct Phenotype Are Highly Elevated in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (2): 410-420.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.046>.
- Takata, Fuyuko, Noriko Sumi, Tsuyoshi Nishioku, *et al.* 2008. « Oncostatin M Induces Functional and Structural Impairment of Blood-Brain Barriers Comprised of Rat Brain Capillary Endothelial Cells ». *Neuroscience Letters* 441 (2): 163-66. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.06.030>.
- Tan, Bruce K., Aiko I. Klingler, Julie A. Poposki, *et al.* 2017. « Heterogeneous Inflammatory Patterns in Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps in Chicago, Illinois ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (2): 699-703.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.063>.
- Tan, Bruce K., Quan-Zhen Li, Lydia Suh, *et al.* 2011. « Evidence for Intranasal Antinuclear Autoantibodies in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (6): 1198-1206.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.08.037>.
- Tan, Bruce K., Jin-Young Min, et Kathryn E. Hulse. 2017. « Acquired Immunity in Chronic Rhinosinusitis ». *Current Allergy and Asthma Reports* 17 (7): 49. <https://doi.org/10.1007/s11882-017-0715-0>.
- Tan, Bruce K., Anju T. Peters, Robert P. Schleimer, et Kathryn E. Hulse. 2018. « Pathogenic and Protective Roles of B Cells and Antibodies in Patients with Chronic Rhinosinusitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (5): 1553-60. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.03.002>.
- Tan, Cuiyan, Mehak K. Aziz, Jenna D. Lovaas, *et al.* 2010. « Antigen-Specific Th9 Cells Exhibit Uniqueness in Their Kinetics of Cytokine Production and Short Retention at the Inflammatory Site ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (11): 6795-6801. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001676>.
- Tanaka, M., et A. Miyajima. 2003. « Oncostatin M, a Multifunctional Cytokine ». *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 149: 39-52. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0013-1>.
- Temann, U. A., G. P. Geba, J. A. Rankin, et R. A. Flavell. 1998. « Expression of Interleukin 9 in the

Lungs of Transgenic Mice Causes Airway Inflammation, Mast Cell Hyperplasia, and Bronchial Hyperresponsiveness ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (7): 1307-20. <https://doi.org/10.1084/jem.188.7.1307>.

Temann, Ulla-Angela, Yasmina Laouar, Elizabeth E. Eynon, *et al.* Flavell. 2007. « IL9 Leads to Airway Inflammation by Inducing IL13 Expression in Airway Epithelial Cells ». *International Immunology* 19 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1093/intimm/dx1117>.

Temann, Ulla-Angela, Prabir Ray, et Richard A. Flavell. 2002. « Pulmonary Overexpression of IL-9 Induces Th2 Cytokine Expression, Leading to Immune Pathology ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (1): 29-39. <https://doi.org/10.1172/JCI13696>.

Tengroth, Lotta, Camilla Rydberg Millrud, Anne Månsson Kvarnhammar, *et al.* 2014. « Functional Effects of Toll-like Receptor (TLR)3, 7, 9, RIG-I and MDA-5 Stimulation in Nasal Epithelial Cells ». *PLoS One* 9 (6): e98239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098239>.

Terwee, Caroline B., Lidwine B. Mokkink, Dirk L. Knol, *et al.* 2012. « Rating the Methodological Quality in Systematic Reviews of Studies on Measurement Properties: A Scoring System for the COSMIN Checklist ». *Quality of Life Research* 21 (4): 651-57. <https://doi.org/10.1007/s11136-011-9960-1>.

Tesar, Devin B., Noreen E. Tiangco, et Pamela J. Bjorkman. 2006. « Ligand Valency Affects Transcytosis, Recycling and Intracellular Trafficking Mediated by the Neonatal Fc Receptor ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7 (9): 1127-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00457.x>.

Thornton, David J., Karine Rousseau, et Michael A. McGuckin. 2008. « Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus ». *Annual Review of Physiology* 70: 459-86. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702>.

Thunberg, Ulrica, Svante Hugosson, Stefan Monecke, *et al.* 2015. « Molecular Characteristics of Staphylococcus Aureus Associated with Chronic Rhinosinusitis ». *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 123 (1): 37-44. <https://doi.org/10.1111/apm.12299>.

Tian, E., J. R. Sawyer, D. A. Largaespada, *et al.* 2000. « Evi27 Encodes a Novel Membrane Protein with Homology to the IL17 Receptor ». *Oncogene* 19 (17): 2098-2109. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203577>.

Tilley, Ann E., Matthew S. Walters, Renat Shaykhiev, et Ronald G. Crystal. 2015. « Cilia Dysfunction in Lung Disease ». *Annual Review of Physiology* 77: 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071931>.

Tipirneni, Kiranya E., Shaoyan Zhang, Do-Yeon Cho, *et al.* 2018. « Submucosal Gland Mucus Strand Velocity Is Decreased in Chronic Rhinosinusitis ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 8 (4): 509-12. <https://doi.org/10.1002/alr.22065>.

Tomassen, Peter, Griet Vandeplass, Thibaut Van Zele, *et al.* 2016. « Inflammatory Endotypes of Chronic Rhinosinusitis Based on Cluster Analysis of Biomarkers ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (5): 1449-1456.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1324>.

Toppila-Salmi, Sanna, Cornelis M. van Drunen, Wytske J. Fokkens, *et al.* 2015. « Molecular Mechanisms of Nasal Epithelium in Rhinitis and Rhinosinusitis ». *Current Allergy and Asthma Reports* 15 (2): 495. <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0495-8>.

Tos, M., et C. Mogensen. 1977. « Pathogenesis of Nasal Polyps ». *Rhinology* 15 (2): 87-95.

Tosun, Fuat, Hasan Huseyin Arslan, Yildirim Karlioglu, *et al.* 2010. « Relationship between Postoperative Recurrence Rate and Eosinophil Density of Nasal Polyps ». *The Annals of Otolaryngology and Laryngology* 119 (7): 455-59. <https://doi.org/10.1177/000348941011900705>.

Tsai, Yih-Jeng, Jessie Chao-Yun Chi, Chung-Yu Hao, et Wen-Bin Wu. 2018. « Peptidoglycan Induces Bradykinin Receptor 1 Expression through Toll-like Receptor 2 and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Human Nasal Mucosa-Derived Fibroblasts of Chronic Rhinosinusitis Patients ». *Journal of Cellular Physiology* 233 (9): 7226-38. <https://doi.org/10.1002/jcp.26553>.

Tsybikov, Namjil N., Elena V. Egorova, Boris I. Kuznik, *et al.* 2015. « Anticytokine Autoantibodies in Chronic Rhinosinusitis ». *Allergy and Asthma Proceedings* 36 (6): 473-80. <https://doi.org/10.2500/aap.2015.36.3880>.

Turner, Jonathan, Jan Roger, Juliette Fitau, *et al.* 2011. « Goblet Cells Are Derived from a FOXJ1-Expressing Progenitor in a Human Airway Epithelium ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 44 (3): 276-84. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0304OC>.

Ugwoke, Michael I., Remigius U. Agu, Norbert Verbeke, et Renaat Kinget. 2005. « Nasal Mucoadhesive Drug Delivery: Background, Applications, Trends and Future Perspectives ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (11): 1640-65. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.009>.

Vaccaro, Carlos, Roger Bawdon, Sylvia Wanjie, *et al.* 2006. « Divergent Activities of an Engineered Antibody in Murine and Human Systems Have Implications for Therapeutic Antibodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (49): 18709-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606304103>.

Vaccaro, Carlos, Jinchun Zhou, Raimund J. Ober, et E. Sally Ward. 2005. « Engineering the Fc Region

of Immunoglobulin G to Modulate *in vivo* Antibody Levels ». *Nature Biotechnology* 23 (10): 1283-88. <https://doi.org/10.1038/nbt1143>.

Valente, Delphine, Christine Mauriac, Thorsten Schmidt, *et al.* 2020. « Pharmacokinetics of Novel Fc-Engineered Monoclonal and Multispecific Antibodies in Cynomolgus Monkeys and Humanized FcRn Transgenic Mouse Models ». *MAbs* 12 (1): 1829337. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1829337>.

Van Epps, D. E., et A. D. Bankhurst. 1978. « Human Eosinophils: Surface Receptors and Antibody-Dependent Cytotoxicity ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 91 (4): 612-17.

Van Zele, T., S. Claeys, P. Gevaert, *et al.* 2006. « Differentiation of Chronic Sinus Diseases by Measurement of Inflammatory Mediators ». *Allergy* 61 (11): 1280-89. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01225.x>.

Van Zele, Thibaut, Frauke Coppieters, Philippe Gevaert, *et al.* 2009. « Local Complement Activation in Nasal Polyposis ». *The Laryngoscope* 119 (9): 1753-58. <https://doi.org/10.1002/lary.20484>.

Van Zele, Thibaut, Philippe Gevaert, Jean-Baptiste Watelet, *et al.* 2004. « Staphylococcus Aureus Colonization and IgE Antibody Formation to Enterotoxins Is Increased in Nasal Polyposis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114 (4): 981-83. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.07.013>.

Vanderhaegen, Thibault, Isabelle Gengler, Arnaud Dendooven, *et al.* 2022. « Eosinophils in the Field of Nasal Polyposis: Towards a Better Understanding of Biologic Therapies ». *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 62 (1): 90-102. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08844-7>.

Vatrella, Alessandro, Immacolata Fabozzi, Cecilia Calabrese, *et al.* 2014. « Dupilumab: A Novel Treatment for Asthma ». *Journal of Asthma and Allergy* 7: 123-30. <https://doi.org/10.2147/JAA.S52387>.

Vaughn, D. E., et P. J. Bjorkman. 1998. « Structural Basis of PH-Dependent Antibody Binding by the Neonatal Fc Receptor ». *Structure (London, England: 1993)* 6 (1): 63-73. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00008-2](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00008-2).

Vaughn, D. E., C. M. Milburn, D. M. Penny, *et al.* 1997. « Identification of Critical IgG Binding Epitopes on the Neonatal Fc Receptor ». *Journal of Molecular Biology* 274 (4): 597-607. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1388>.

Vélez-Cordero, J. Rodrigo, et Eric Lauga. 2013. « Waving Transport and Propulsion in a Generalized Newtonian Fluid ». *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* 199 (septembre): 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.jnnfm.2013.05.006>.

Vermeer, Paola D., Robert Harson, Lisa A. Einwalter, *et al.* 2003. « Interleukin-9 Induces Goblet Cell Hyperplasia during Repair of Human Airway Epithelia ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 28 (3): 286-95. <https://doi.org/10.1165/rcmb.4887>.

Verstraete, Kenneth, Frank Peelman, Harald Braun, *et al.* 2017. « Structure and Antagonism of the Receptor Complex Mediated by Human TSLP in Allergy and Asthma ». *Nature Communications* 8 (avril): 14937. <https://doi.org/10.1038/ncomms14937>.

Vlaminck, Stephan, Tom Vauterin, Peter W. Hellings, *et al.* 2014. « The Importance of Local Eosinophilia in the Surgical Outcome of Chronic Rhinosinusitis: A 3-Year Prospective Observational Study ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 28 (3): 260-64. <https://doi.org/10.2500/ajra.2014.28.4024>.

Voehringer, David. 2013. « Protective and Pathological Roles of Mast Cells and Basophils ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (5): 362-75. <https://doi.org/10.1038/nri3427>.

Vries, J. E. de. 1998. « The Role of IL-13 and Its Receptor in Allergy and Inflammatory Responses ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102 (2):165-69. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(98\)70080-6](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(98)70080-6).

Wada, Ryuta, Makoto Matsui, et Nana Kawasaki. 2019. « Influence of N-Glycosylation on Effector Functions and Thermal Stability of Glycoengineered IgG1 Monoclonal Antibody with Homogeneous Glycoforms ». *MAbs* 11 (2): 350-72. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1551044>.

Walsh, Garry M. 2013. « Profile of Reslizumab in Eosinophilic Disease and Its Potential in the Treatment of Poorly Controlled Eosinophilic Asthma ». *Biologics: Targets & Therapy* 7: 7-11. <https://doi.org/10.2147/BTT.S30133>.

Wang, Bao-Feng, Ping-Ping Cao, James E. Norton, *et al.* 2023. « Evidence That Oncostatin M Synergizes with IL-4 Signaling to Induce TSLP Expression in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, janvier, S0091-6749(23)00003-9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.11.029>.

Wang, Hai, Zhi-Yong Li, Wen-Xiu Jiang, *et al.* 2018. « The Activation and Function of IL-36 $\gamma$  in Neutrophilic Inflammation in Chronic Rhinosinusitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (5): 1646-58. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.972>.

Wang, Min, Nan Zhang, Ming Zheng, *et al.* 2019. « Cross-Talk between TH2 and TH17 Pathways in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 144 (5): 1254-64. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.06.023>.

Wang, W. W., D. M. Lu, M. Zheng, *et al.* 2018. « TSLP Regulates Eotaxin-1 Production by Nasal Epithelial Cells from Patients with Eosinophilic CRSwNP ». *Rhinology* 56 (4): 370-77. <https://doi.org/10.4193/Rhin17.045>.

- Wang, Xiangdong, Nan Zhang, Mingyu Bo, *et al.* 2016. « Diversity of TH Cytokine Profiles in Patients with Chronic Rhinosinusitis: A Multicenter Study in Europe, Asia, and Oceania ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (5): 1344-53. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.041>.
- Wang, Yui-Hsi, et Yong-Jun Liu. 2008. « The IL-17 Cytokine Family and Their Role in Allergic Inflammation ». *Current Opinion in Immunology* 20 (6): 697-702. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.09.004>.
- Wani, Manzoor A., Lynn D. Haynes, Jonghan Kim, *et al.* 2006. « Familial Hypercatabolic Hypoproteinemia Caused by Deficiency of the Neonatal Fc Receptor, FcRn, Due to a Mutant Beta2-Microglobulin Gene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (13): 5084-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600548103>.
- Wanner, A., M. Salathé, et T. G. O’Riordan. 1996. « Mucociliary Clearance in the Airways ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (6 Pt 1): 1868-1902. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.6.8970383>.
- Ward, E. Sally, Siva Charan Devanaboyina, et Raimund J. Ober. 2015. « Targeting FcRn for the Modulation of Antibody Dynamics ». *Molecular Immunology* 67 (2 Pt A): 131-41. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.02.007>.
- Ward, E. Sally, et Raimund J. Ober. 2009. « Chapter 4: Multitasking by Exploitation of Intracellular Transport Functions the Many Faces of FcRn ». *Advances in Immunology* 103: 77-115. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(09\)03004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(09)03004-1).
- Watanabe, Norihiko, Shino Hanabuchi, Vassili Soumelis, *et al.* 2004. « Human Thymic Stromal Lymphopoietin Promotes Dendritic Cell-Mediated CD4+ T Cell Homeostatic Expansion ». *Nature Immunology* 5 (4): 426-34. <https://doi.org/10.1038/ni1048>.
- Watelet, Jean-Baptiste, Jean-Michel Dogne, et François Mullier. 2015. « Remodeling and Repair in Rhinosinusitis ». *Current Allergy and Asthma Reports* 15 (6): 34. <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0531-3>.
- Weathington, Nathaniel M., Anneke H. van Houwelingen, Brett D. Noerager, *et al.* 2006. « A Novel Peptide CXCR Ligand Derived from Extracellular Matrix Degradation during Airway Inflammation ». *Nature Medicine* 12 (3): 317-23. <https://doi.org/10.1038/nm1361>.
- Weller, Peter F., et Lisa A. Spencer. 2017. « Functions of Tissue-Resident Eosinophils ». *Nature Reviews. Immunology* 17 (12): 746-60. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.95>.
- West, Nathaniel R., Benjamin M. J. Owens, et Ahmed N. Hegazy. 2018. « The Oncostatin M-Stromal Cell Axis in Health and Disease ». *Scandinavian Journal of Immunology* 88 (3): e12694. <https://doi.org/10.1111/sji.12694>.
- White, Barbara, Francisco Leon, Wendy White, et Gabriel Robbie. 2009. « Two First-in-Human, Open-Label, Phase I Dose-Escalation Safety Trials of MEDI-528, a Monoclonal Antibody against Interleukin-9, in Healthy Adult Volunteers ». *Clinical Therapeutics* 31 (4): 728-40. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2009.04.019>.
- Whittaker, Laurie, Naiqian Niu, U.-Angela Temann, *et al.* 2002. « Interleukin-13 Mediates a Fundamental Pathway for Airway Epithelial Mucus Induced by CD4 T Cells and Interleukin-9 ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 27 (5): 593-602. <https://doi.org/10.1165/rcmb.4838>.
- Widdicombe, J. H., et J. G. Widdicombe. 1995. « Regulation of Human Airway Surface Liquid ». *Respiration Physiology* 99 (1): 3-12. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(94\)00095-h](https://doi.org/10.1016/0034-5687(94)00095-h).
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, *et al.* 1998. « Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5397): 2258-61. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2258>.
- Wills-Karp, Marsha, et Fred D. Finkelman. 2008. « Untangling the Complex Web of IL-4- and IL-13-Mediated Signaling Pathways ». *Science Signaling* 1 (51): pe55. <https://doi.org/10.1126/scisignal.1.51.pe55>.
- Wilmot, H. V., J. Hogwood, et E. Gray. 2014. « Recombinant Factor IX: Discrepancies between One-Stage Clotting and Chromogenic Assays ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 20 (6): 891-97. <https://doi.org/10.1111/hae.12449>.
- Wilmot, Helen V., et Elaine Gray. 2018. « Potency Estimates for Recombinant Factor IX in the One-Stage Clotting Assay Are Influenced by More than Just the Choice of Activated Partial Thromboplastin Time Reagent ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 24 (5): e363-68. <https://doi.org/10.1111/hae.13556>.
- Winner, P., A. D. Rothner, J. Saper, *et al.* 2000. « A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Sumatriptan Nasal Spray in the Treatment of Acute Migraine in Adolescents ». *Pediatrics* 106 (5): 989-97. <https://doi.org/10.1542/peds.106.5.989>.
- Wise, Sarah K., Kyle A. Den Beste, Elizabeth K. Hoddeson, *et al.* 2013. « Sinonasal Epithelial Wound Resealing in an *in vitro* Model: Inhibition of Wound Closure with IL-4 Exposure ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 3 (6): 439-49. <https://doi.org/10.1002/alr.21158>.
- Wise, Sarah K., Adrienne M. Laury, Elizabeth H. Katz, *et al.* 2014. « Interleukin-4 and Interleukin-13 Compromise the Sinonasal Epithelial Barrier and Perturb Intercellular Junction Protein Expression ». *International Forum of Allergy & Rhinology* 4 (5): 361-70. <https://doi.org/10.1002/alr.21298>.
- Wolburg, Hartwig, Karen Wolburg-Buchholz, Heike Sam, *et al.* 2008. « Epithelial and Endothelial

- Barriers in the Olfactory Region of the Nasal Cavity of the Rat ». *Histochemistry and Cell Biology* 130 (1): 127-40. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0410-2>.
- Wood, Lorna J., Roma Sehmi, Sandra Dorman, *et al.* 2002. « Allergen-Induced Increases in Bone Marrow T Lymphocytes and Interleukin-5 Expression in Subjects with Asthma ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166 (6): 883-89. <https://doi.org/10.1164/rccm.2108015>.
- Woodruff, Prescott G., Barmak Modrek, David F. Choy, *et al.* 2009. « T-Helper Type 2-Driven Inflammation Defines Major Subphenotypes of Asthma ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180 (5): 388-95. <https://doi.org/10.1164/rccm.200903-0392OC>.
- Wynn, Thomas A. 2015. « Type 2 Cytokines: Mechanisms and Therapeutic Strategies ». *Nature Reviews. Immunology* 15 (5): 271-82. <https://doi.org/10.1038/nri3831>.
- Wynn, Thomas A., et Luke Barron. 2010. « Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis ». *Seminars in Liver Disease* 30 (3): 245-57. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>.
- Wynn, Thomas A., et Kevin M. Vannella. 2016. « Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis ». *Immunity* 44 (3): 450-62. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>.
- Wynne, Michael, Carl Atkinson, Rodney J. Schlosser, et Jennifer K. Mulligan. 2019. « Contribution of Epithelial Cell Dysfunction to the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 33 (6): 782-90. <https://doi.org/10.1177/1945892419868588>.
- Xiao, Li, Lei Jia, Lu Bai, *et al.* 2016. « Phenotypic and Functional Characteristics of IL-21-Expressing CD8(+) T Cells in Human Nasal Polyps ». *Scientific Reports* 6 (juillet): 30362. <https://doi.org/10.1038/srep30362>.
- Xu, G., L. Zhang, D. Y. Wang, *et al.* 2010. « Opposing Roles of IL-17A and IL-25 in the Regulation of TSLP Production in Human Nasal Epithelial Cells ». *Allergy* 65 (5): 581-89. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02252.x>.
- Xu, Junyang, Fengxia Jiang, Fariba Nayeri, et Olle Zetterström. 2007. « Apoptotic Eosinophils in Sputum from Asthmatic Patients Correlate Negatively with Levels of IL-5 and Eotaxin ». *Respiratory Medicine* 101 (7): 1447-54. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.01.026>.
- Yaghi, Asma, Aisha Zaman, Gerard Cox, et Myrna B. Dolovich. 2012. « Ciliary Beating Is Depressed in Nasal Cilia from Chronic Obstructive Pulmonary Disease Subjects ». *Respiratory Medicine* 106 (8): 1139-47. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2012.04.001>.
- Yamaya, M., W. E. Finkbeiner, S. Y. Chun, et J. H. Widdicombe. 1992. « Differentiated Structure and Function of Cultures from Human Tracheal Epithelium ». *The American Journal of Physiology* 262 (6 Pt 1): L713-724. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.6.L713>.
- Ye, Lilin, Rongyu Zeng, Yu Bai, *et al.* 2011. « Efficient Mucosal Vaccination Mediated by the Neonatal Fc Receptor ». *Nature Biotechnology* 29 (2): 158-63. <https://doi.org/10.1038/nbt.1742>.
- Yeh, Chiou-Yueh, Te-Huei Yeh, Chiau-Jing Jung, Pei-Lin Chen, Huei-Ting Lien, et Jean-San Chia. 2013. « Activated Human Nasal Epithelial Cells Modulate Specific Antibody Response against Bacterial or Viral Antigens ». *PLoS One* 8 (2): e55472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055472>.
- Yeo, Nam-Kyung, et Yong Ju Jang. 2010. « Rhinovirus Infection-Induced Alteration of Tight Junction and Adherens Junction Components in Human Nasal Epithelial Cells ». *The Laryngoscope* 120 (2): 346-52. <https://doi.org/10.1002/lary.20764>.
- Ying, Sun, Brian O'Connor, Jonathan Ratoff, *et al.* 2005. « Thymic Stromal Lymphopoietin Expression Is Increased in Asthmatic Airways and Correlates with Expression of Th2-Attracting Chemokines and Disease Severity ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (12): 8183-90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.8183>.
- Yoshida, Masaru, Steven M. Claypool, Jessica S. Wagner, *et al.* 2004. « Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells ». *Immunity* 20 (6): 769-83. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.007>.
- Yoshida, Masaru, Kanna Kobayashi, Timothy T. Kuo, *et al.* 2006. « Neonatal Fc Receptor for IgG Regulates Mucosal Immune Responses to Luminal Bacteria ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (8): 2142-51. <https://doi.org/10.1172/JCI27821>.
- Yoshimoto, T., et W. E. Paul. 1994. « CD4pos, NK1.1pos T Cells Promptly Produce Interleukin 4 in Response to *in vivo* Challenge with Anti-CD3 ». *The Journal of Experimental Medicine* 179 (4): 1285-95. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1285>.
- Yu, Sanhong, Hye Young Kim, Ya-Jen Chang, *et al.* 2014. « Innate Lymphoid Cells and Asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (4): 943-50; quiz 51. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.02.015>.
- Yu, Xue Min, Chun Wei Li, Ying Ying Li, *et al.* 2013. « Down-Regulation of EMP1 Is Associated with Epithelial Hyperplasia and Metaplasia in Nasal Polyps ». *Histopathology* 63 (5): 686-95. <https://doi.org/10.1111/his.12211>.
- Yun, Seong-Hoon, Eun-Hye Sim, Ri-Young Goh, Joo-In Park, et Jin-Yeong Han. 2016. « Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers ». *BioMed Research International* 2016: 9060143. <https://doi.org/10.1155/2016/9060143>.

- Zahm, J. M., M. Chevillard, et E. Puchelle. 1991. « Wound Repair of Human Surface Respiratory Epithelium ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 5 (3): 242-48. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/5.3.242>.
- Zaman, S. M. A., F. G. H. Hill, B. Palmer, et al. 2011. « The Risk of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease among UK Patients with Bleeding Disorders, Known to Have Received Potentially Contaminated Plasma Products ». *Haemophilia* 17 (6): 931-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2011.02508.x>.
- Zanon, Ezio, Samantha Pasca, Francesco Demartis, et al. 2022. « Intracranial Haemorrhage in Haemophilia Patients Is Still an Open Issue: The Final Results of the Italian EMO.REC Registry ». *Journal of Clinical Medicine* 11 (7): 1969. <https://doi.org/10.3390/jcm11071969>.
- Zhai, Guan-Ting, Jing-Xian Li, Xin-Hao Zhang, et al. 2019. « Increased Accumulation of CD30 Ligand-Positive Mast Cells Associates with Eosinophilic Inflammation in Nasal Polyps ». *The Laryngoscope* 129 (3): E110-17. <https://doi.org/10.1002/lary.27658>.
- Zhai, Guan-Ting, Hai Wang, Jing-Xian Li, et al. 2018. « IgD-Activated Mast Cells Induce IgE Synthesis in B Cells in Nasal Polyps ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 142 (5): 1489-1499.e23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.025>.
- Zhang, J., R. Kuvelkar, N. J. Murgolo, S. S. Taremi, et al. 1999. « Mapping and Characterization of the Epitope(s) of Sch 55700, a Humanized MAb, That Inhibits Human IL-5 ». *International Immunology* 11 (12): 1935-44. <https://doi.org/10.1093/intimm/11.12.1935>.
- Zhang, N., K. Van Crombruggen, E. Gevaert, et C. Bachert. 2016. « Barrier Function of the Nasal Mucosa in Health and Type-2 Biased Airway Diseases ». *Allergy* 71 (3): 295-307. <https://doi.org/10.1111/all.12809>.
- Zhang, Nan, Gabriele Holtappels, Cindy Claeys, et al. 2006. « Pattern of Inflammation and Impact of Staphylococcus Aureus Enterotoxins in Nasal Polyps from Southern China ». *American Journal of Rhinology* 20 (4): 445-50. <https://doi.org/10.2500/ajr.2006.20.2887>.
- Zhang, Nan, Thibaut Van Zele, Claudina Perez-Novo, et al. 2008. « Different Types of T-Effector Cells Orchestrate Mucosal Inflammation in Chronic Sinus Disease ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122 (5): 961-68. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.07.008>.
- Zhang, Y., L. Derycke, G. Holtappels, et al. 2019. « Th2 Cytokines Orchestrate the Secretion of MUC5AC and MUC5B in IL-5-Positive Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps ». *Allergy* 74 (1): 131-40. <https://doi.org/10.1111/all.13489>.
- Zhang, Yuan, Elien Gevaert, Hongfei Lou, et al. 2017. « Chronic Rhinosinusitis in Asia ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (5): 1230-39. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.009>.
- Zhao, Ke-Qing, Andrew T. Cowan, Robert J. Lee, et al. 2012. « Molecular Modulation of Airway Epithelial Ciliary Response to Sneezing ». *FASEB Journal* 26 (8): 3178-87. <https://doi.org/10.1096/fj.11-202184>.
- Zhu, Z., R. J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, et al. 1999. « Pulmonary Expression of Interleukin-13 Causes Inflammation, Mucus Hypersecretion, Subepithelial Fibrosis, Physiologic Abnormalities, and Eotaxin Production ». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (6): 779-88. <https://doi.org/10.1172/JCI5909>.
- Zurawski, G., et J. E. de Vries. 1994. « Interleukin 13, an Interleukin 4-like Cytokine That Acts on Monocytes and B Cells, but Not on T Cells ». *Immunology Today* 15 (1): 19-26. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90021-3).

# Annexes



### **Axe 1**

<b>Annexe 1.</b> Externally Sponsored Research for Astrazeneca.....	289
<b>Annexe 2.</b> Investigator Sponsored Studies for Sanofi.....	299
<b>Annexe 3.</b> Questionnaire de qualité de vie SNOT-22 .....	309
<b>Annexe 4.</b> Score de sévérité et de contrôle de l'asthme .....	313
<b>Annexe 5.</b> CRF de l'étude PSI.....	317
<b>Annexe 6.</b> Note d'information de l'étude PSI.....	329

### **Axe 2**

<b>Annexe 7.</b> Manuscrit de la revue de la littérature sur la chirurgie dans la PNS.....	333
<b>Annexe 8.</b> Protocole de mise en culture .....	351
<b>Annexe 9.</b> Protocole de mesure de la résistance électrique transépithéliale .....	355
<b>Annexe 10.</b> Protocole de préparation des lames pour l'immunofluorescence .....	359
<b>Annexe 11.</b> Protocole de l'étude de la clairance mucociliaire.....	363
<b>Annexe 12.</b> Protocole de l'étude de la réparation épithéliale .....	367

### **Axe 3**

<b>Annexe 13.</b> Rappel sur l'hémostase .....	371
<b>Annexe 14.</b> Protocole ELISA.....	381
<b>Annexe 15.</b> Protocole western blot .....	385
<b>Annexe 16.</b> Protocole dosage chromogénique .....	389



# Annexe 1



## Externally Sponsored Research TEMPLATE - Non clinical Research

### ▪ **Hypothesis**

#### 1. Rationale of the study

#### ***Epidemiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP)***

Primary nasal polyposis, also called chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), is a common disease that affects 4% of the population. Symptoms related to growth of polyps within the sinonasal cavities include hyposmia, nasal congestion and discharge, and facial pain. The age of discovery of the disease is between 40 and 50 years old. CRSwNP may be associated with asthma (30 to 40% of cases), or aspirin intolerance (15% of cases)(1). Endoscopic examination shows the presence of nasal polyps in both nasal fossa although they may be asymmetric in size. The functional impact of CRSwNP is major and can significantly alter the quality of life of patients (2). Medical treatment is always recommended by most guidelines including intranasal glucocorticoids and saline irrigations (3). In patients with severe symptoms or in whom initial treatment has failed to achieve adequate control, a short course of oral glucocorticoids may be considered. A Cochrane review showed a short-term benefit of a short course of systemic corticosteroids as compared with placebo or no treatment (4). Endoscopic sinus surgery is usually proposed to patients who still have severe symptoms despite an adequate medical treatment or who require repeated oral steroids (>3 weeks per year). Surgery aims to remove polyps as well as to improve access to ongoing topical therapy. However, after surgery, 40% of patients present a recurrence of polyps at 18 months (5) and 20% of patients require revision surgery at 5 years (6). CRSwNP is characterized by persistent mucosal inflammation which is a result of inappropriate or excessive immune response to various aggressions. Monoclonal antibodies that directly target the inflammatory pathway have been suggested as a new therapy for CRSwNP. They have been used to treat various diseases such as cancer, autoimmune diseases, or infectious diseases (7) for several years and 3 molecules have been validated in phase 3 randomized control trial in CRSwNP. Dupilumab, a fully human monoclonal antibody to the IL-4R $\alpha$  (8–10), Omalizumab, a human monoclonal antibody to the IgE, and Mepolizumab, a human monoclonal antibodies to IL-5 have all proven their efficacy on the overall symptomatology in CRSwNP (therapeutic protocol: subcutaneous injection every 1-4 weeks) with good tolerance (11–13). Benralizumab has also been tested in a phase 3 randomized control trial (RCT) completed but not published yet (Efficacy and Safety Study of Benralizumab for Patients With Severe Nasal Polyposis (OSTRO), ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03401229).

#### ***Pathophysiology of CRSwNP***

Despite recent advances in the description of cellular and molecular mechanisms involved in CRSwNP, the epithelial and inflammatory processes leading to nasal polyp (NP) growth are still to be better characterized (14). Amongst CRS inflammatory phenotypes, a T-helper (Th)1-predominant pattern of cytokines is typically encountered in infectious rhinosinusitis, whereas a Th2 pattern is observed in allergic and eosinophilic sinonasal inflammation (15,16). Th-2 mediators including interleukin (IL)-4, IL-13, IL-5, and increased concentrations of IgE, has been reported in the NPs of 85% of patients with CRSwNP in western countries (17). On the other hand, 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 (18–21). A recent review describes how dysfunction of the airway epithelium contributes to the pathogenesis of CRSwNP and suggests that mucociliary clearance (22) and epithelial barrier function (14) could be altered in

NPs. Furthermore, dysregulation of epithelial wound repair with an inability to obtain ad integrum repair of the nasal airway epithelium has been described in NPs (23). Indeed, epithelial wound repair characterized by basal cell (BC) spreading and migration, followed by proliferation and differentiation, is an important process to rapidly restore epithelial barrier integrity (24). Persistent epithelial barrier dysfunction may lead to aberrant airway remodeling including epithelial cell shedding and BC and mucous cell hyperplasia (24,25). It has been suggested that an ineffective Th1-based local immune response combined with increased Th2 cytokine activity contributes to an increased presence of eosinophils, which then lead to the formation of new polyps (26). The first large study attempting to define the endotypes of CRS with tissue data used a modified cluster analysis of preselected tissue biomarkers including Type 1, 2 and 3 canonical cytokines, neutrophilic markers, IgE to staphylococcal superantigens, albumin, TGF-beta, IL-6 and IL-1b. Results indicated 10 endotypes including four that were characterized as IL-5 negative and six as IL-5 positive. Of these six, three were considered high IL-5 and had the strongest association with asthma and the presence of polyps pointing out the importance of IL-5 in the genesis of CRSwNP (27,28).

#### ***Human nasal epithelial cells (HNEC) from primary culture model in air-liquid interface (ALI)***

HNECs are obtained from NPs tissue removed during sinus surgery, usually eliminated as surgical waste. Approval from the ethic committee of Ile de France X was obtained in Creteil for research use of surgical waste (CPP IDF X 2016-01-01). After an enzymatic digestion, cells are plated in inserts and then placed in air/liquid interface (ALI) after 24 hours. 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 (29). Culture medium (Stemcell, Pneumacult -ALI medium) is changed daily, and the HNECs reach a stable differentiated state with the detection of ciliated, secretory, and basal cells during the third week of culture (Day 21) (30). The ALI allows polarization of the epithelium (i.e., apical surface exposed to air and basal layer in contact with culture medium) close to in vivo situation in the nose. This ALI model of differentiated HNECs therefore closely mimics in vivo conditions, except that they are not in their natural environment, away from the potential inflammatory process occurring in the nasal cavity (29). It constitutes an excellent tool to study cellular and molecular mechanisms involving airway epithelial cells exposed to various stimuli (30,31). This model is therefore highly suitable for the study of IL effects on epithelial airway repair and ciliary beating. This model is also useful to create a specific inflammatory environment, e.g. by adding interleukins to the culture medium (32).

#### ***Interleukin-5 (IL-5)***

The characteristic inflammatory pattern in most asthmatic and CRSwNP patients includes an increase in type 2 helper T (Th2) lymphocytes, eosinophils, basophils, mast cells and type 2 innate lymphoid cells (ILC2). The latter act as first-line defenders in the airway epithelial barrier as they can rapidly produce cytokines. ILC2 correspond to the Th2 subsets of CD4+ cells, controlled by the GATA-3 transcription factor, they produce IL-5 and IL-13 (33). These are not the only cytokines involved in the Th2-predominant type of inflammation (34). Type 2 inflammation is characterized by an increase in type 2 cytokines, including IL-4, IL-9 also involved in eosinophil activation and immunoglobulin E production (35). The stimulation of cultured epithelial cells with IL-5 results in an activation of CCL17 (chemokine) in nasal polyp epithelial cells but not in normal epithelial cells (36). Chemokines are small 8±10 kDa cytokines that induce the migration of various types of leukocytes such as eosinophils (37). In up to 90% of Caucasian patients with CRSwNP, the disease exhibits pathology associated with eosinophils and IL-5 (1). The number of eosinophils in peripheral blood was positively correlated with the number of eosinophils in the nasal mucosa (39). Therefore, the downregulation of IL-5 levels and eosinophil numbers in the peripheral blood might reflect a reduction of eosinophilic inflammation in the nasal mucosa, which might reduce nasal polyp size. Yet, only about half of patients demonstrated significant polyp shrinkage with anti-IL-5 mAb therapy (11). This result suggests that despite being a

predictive marker for disease-severity, eosinophils may account for only a portion of Type 2 CRS pathophysiology. IL-5 binds to the IL-5 receptor (IL-5R) which is expressed almost exclusively on the surface of eosinophils and basophils (38,40). The IL-5 receptor is a heterodimer composed of one alpha subunit (IL-5R $\alpha$ ) and one beta subunit, also found in both IL-3 and GM-CSF receptors (41). IL-5R $\alpha$  expression is significantly higher in asthmatic patients (42). In conclusion, IL-5 is considered as a key cytokine in the genesis of CRSwNP due to its role in the differentiation, proliferation, and activation of eosinophils (38) but its effects on epithelium in CRSwNP remain poorly understood. A previous study showed no effect of IL-5 on epithelial repair. Ref à rajouer 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.

### **Benralizumab**

The majority of CRSwNP in Western countries demonstrate a Type 2 cytokine profile with polyp eosinophilia (43,44). Based on this assumption, development of biologics targeting IL-5 or IL-5R $\alpha$  is expanding. Benralizumab is a humanized, afucosylated, anti-IL-5R alpha monoclonal antibody that is approved for severe eosinophilic asthma in the United States, Europe, and Japan (45). Benralizumab targets the IL-5 receptor on the surface of eosinophils which leads to degradation of signalling, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and apoptosis (46). This direct effect on eosinophils leads to reduction of proinflammatory processes in the asthmatic airways. Benralizumab have proven its efficacy and safety as a biologic to treat CRSwNP in phase 2 randomized controlled trials (RCT). First Takabayashi *et al.* in 2021 with 56 adult patients and a primary endpoint after 12 weeks of treatment, then Tversky *et al.* with 24 patients after 25 weeks. They both used the nasal polyp score as a primary endpoint. A phase 3 RCT in 98 different sites aournd the world named OSTRO has recently been completed but no results are posted yet (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03401229, OSTRO). Another phase 3 RCT including 275 patients with CRSwNP refractory to intranasal corticosteroids receiving a 30 mg subcutaneous injection of either Benralizumab or placebo every 4 weeks for 52 weeks is currently running in Asia.

The restoration of barrier integrity and mucociliary clearance after epithelial wound healing represent a key step in the defense capacity of the airway epithelium. Therefore, in CRSwNP, benralizumab could have a direct effect in human nasal epithelium (HNE) reinforcing its therapeutic impact.

## 2. Aim of the study

### *a. Major aim*

The main objective is to evaluate the *in vitro* effect of IL-5 and Benralizumab on human nasal epithelium mucociliary clearance and barrier function.

### *b. Specific aims*

- To demonstrate the expression of the IL-5R $\alpha$  and its potential location in HNE.
- To evaluate the *in vitro* effect of IL-5 and Benralizumab on HNE ciliary beating and ultrastructure.
- To evaluate the *in vitro* effect of IL-5 and Benralizumab on HNE barrier integrity and differentiation.
- To evaluate the *in vitro* effect of IL-5 and Benralizumab on HNE repair mechanism.

### 3. Study Design

It is a preclinical research that will be performed on a well-known *in vitro* model at air liquid interface of human nasal epithelial cells (HNEC). HNEC are isolated from surgical waste during sinonasal surgery for CRSwNP in the ENT Department of Pr. Coste at the Intercommunal Hospital of Creteil the study was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01). Once extracted from nasal polyps, the HNECs reached a stable differentiated state with the detection of ciliated, secretory, and basal cells during the third week of culture (Day 21). One patient generates at least 1 cell culture plate of 12 wells.

### 4. Sample Size Justification / Statistical Analysis

We estimate at 50 cultures from 50 different patients, the amount of material necessary for the present project. Surgical recruitment at the CHIC easily covers primary culture requirements for this study (at least 3 patients operated each week). Each experimentation needs to be performed in triplicate to ensure reproductibility and extrapolability of results. For each experiment, 4 conditions will be tested, IL-5 alone, IL-5 and Benralizumab, Benralizumab alone and a control (culture medium) will be used. Therefore for 1 experiment 1 cell culture plate of 12 wells is necessary and at least 6 experiments are planned: i) IL-5R expression; ii) transcytosis efficacy; iii) effects of the different conditions on ciliary beating and ciliary ultrastructure; iv) effects on the rheological properties of epithelial mucus using a viscometer; v) effects on epithelial permeability; vi) effects on epithelial differentiation using cytokeratin-14, MUC5AC, and  $\beta_{IV}$  tubulin as immunomarkers of basal, mucus, and ciliated cells vii) effects on epithelial cell repair capacity after wound healing in an *in vitro* model of wound healing and effects on differentiation after wound healing closure. Each experiment is going to be performed at least 3 times for external validity and one proof of concept experiment will be performed before launching the project. Therefore, the minimum number of cultures is 24, considering a 50% success rate, at least 48 cultures are necessary in order to maximize reliability.

#### Product and Requested Funding

Materials	Costs (euros)
Culture of HNEC for 24 months	25 000
EVOM	3000
Viscometer	3000
Automatic epithelial wound	3000
Anti-FcRn antibodies	3000
Antibodies for immunofluorescence	1500
Anti-ZO-1 and anti-ZO-3 ab	2500
Benralizumab: supplied by the industrial partner	0
Anti-Benralizumab ab	3000
Kit ELISA Benralizumab	10 000
Anti-IL-5Ra fluorescent mouse ab	3000
Anti-IL-5R $\alpha$ subunit ab	3000
IL-5	5000
Anti-Cytokeratin 14 ab + Anti-MUC5AC ab + Anti- $\alpha$ tubulin ab	4000
One year full time technician salary	16 000
Publication charges and Open Access	3500
Congress participation	1500
Total for 24 months (45 000/ year)	<b>90 000</b>

#### Publication Expectation (Journal/congress, publication type, anticipated publication date)

1 or 2 published original articles

Top ranking journals : Cell, Nat Immunol, J Allergy Clin Immunol, Rhinology, JAMA ORL, Int J Mol Sci

Anticipated publication date : January 2023

## ▪ References

1. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*. 20 févr 2020;58(Suppl S29):1-464.
2. Mortuaire G, Vandeville S, Chevalier D. Psychometric evaluation of the SinoNasal Outcome Test-16 for quality of life in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. juin 2010;127(3):91-6.
3. Chong LY, Head K, Hopkins C, Philpott C, Schilder AGM, Burton MJ. Intranasal steroids versus placebo or no intervention for chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 26 avr 2016;4:CD011996.
4. Head K, Chong LY, Hopkins C, Philpott C, Schilder AGM, Burton MJ. Short-course oral steroids as an adjunct therapy for chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 26 avr 2016;4:CD011992.
5. DeConde AS, Mace JC, Levy JM, Rudmik L, Alt JA, Smith TL. Prevalence of polyp recurrence after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *The Laryngoscope*. mars 2017;127(3):550-5.
6. Hopkins C, Slack R, Lund V, Brown P, Copley L, Browne J. Long-term outcomes from the English national comparative audit of surgery for nasal polyposis and chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*. déc 2009;119(12):2459-65.
7. Chari RVJ, Miller ML, Widdison WC. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. 7 avr 2014;53(15):3796-827.
8. Bachert C, Mannent L, Naclerio RM, Mullol J, Ferguson BJ, Gevaert P, et al. Effect of Subcutaneous Dupilumab on Nasal Polyp Burden in Patients With Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2 févr 2016;315(5):469-79.
9. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, Hellings PW, Amin N, Lee SE, et al. 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 Lond Engl*. 2 nov 2019;394(10209):1638-50.
10. Bachert C, Zinreich SJ, Hellings PW, Mullol J, Hamilos DL, Gevaert P, et al. Dupilumab reduces opacification across all sinuses and related symptoms in patients with CRSwNP. *Rhinology*. 1 févr 2020;58(1):10-7.
11. Bachert C, Sousa AR, Lund VJ, Scadding GK, Gevaert P, Nasser S, et al. Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *J Allergy Clin Immunol*. oct 2017;140(4):1024-1031.e14.
12. Gevaert P, Omachi TA, Corren J, Mullol J, Han J, Lee SE, et al. Efficacy and safety of omalizumab in nasal polyposis: 2 randomized phase 3 trials. *J Allergy Clin Immunol*. sept 2020;146(3):595-605.

13. Han JK, Bachert C, Fokkens W, Desrosiers M, Wagenmann M, Lee SE, et al. Mepolizumab for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (SYNAPSE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 16 avr 2021;
14. 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*. nov 2012;130(5):1087-1096.e10.
15. Riechelmann H, Deutschle T, Rozsasi A, Keck T, Polzehl D, Bürner H. Nasal biomarker profiles in acute and chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. sept 2005;35(9):1186-91.
16. Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy*. nov 2006;61(11):1280-9.
17. Van Bruaene N, Pérez-Novo CA, Basinski TM, Van Zele T, Holtappels G, De Ruyck N, et al. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *J Allergy Clin Immunol*. juin 2008;121(6):1435-41, 1441.e1-3.
18. Wladislawosky-Waserman P, Kern EB, Holley KE, Eisenbrey AB, Gleich GJ. Epithelial damage in nasal polyps. *Clin Allergy*. mai 1984;14(3):241-7.
19. Coste A, Rateau JG, Bernaudin JF, Peynègre R, Escudier E. Nasal polyposis pathogenesis: a flow cytometric and immunohistochemical study of epithelial cell proliferation. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. sept 1996;116(5):755-61.
20. 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. *The Laryngoscope*. mai 1996;106(5 Pt 1):578-83.
21. 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*. sept 2015;136(3):737-746.e4.
22. 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*. nov 2019;33(6):782-90.
23. 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 Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. mars 2006;263(3):282-9.
24. Puchelle E, Zahm J-M, Tournier J-M, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. nov 2006;3(8):726-33.
25. Lloyd CM, Robinson DS. Allergen-induced airway remodelling. *Eur Respir J*. mai 2007;29(5):1020-32.

26. Ramanathan M, Lee W-K, Spannake EW, Lane AP. Th2 cytokines associated with chronic rhinosinusitis with polyps down-regulate the antimicrobial immune function of human sinonasal epithelial cells. *Am J Rhinol. avr* 2008;22(2):115-21.
27. Bachert C, Zhang N, Hellings PW, Bousquet J. Endotype-driven care pathways in patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol. mai* 2018;141(5):1543-51.
28. Tomassen P, Vandeplass G, Van Zele T, Cardell L-O, Arebro J, Olze H, et al. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin Immunol. mai* 2016;137(5):1449-1456.e4.
29. Papon J-F, Coste A, Gendron M-C, Cordonnier C, Wingerstmann L, Peynègre R, et al. HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *The Laryngoscope. nov* 2002;112(11):2067-75.
30. Cao H, Ouyang H, Grasemann 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. juin* 2018;29(6):643-52.
31. Secondo LE, Liu NJ, Lewinski NA. Methodological considerations when conducting in vitro, air-liquid interface exposures to engineered nanoparticle aerosols. *Crit Rev Toxicol. mars* 2017;47(3):225-62.
32. Everman JL, Rios C, Seibold MA. Utilization of Air-Liquid Interface Cultures as an In Vitro Model to Assess Primary Airway Epithelial Cell Responses to the Type 2 Cytokine Interleukin-13. *Methods Mol Biol Clifton NJ. 2018;1799:419-32.*
33. Krabbendam L, Bal SM, Spits H, Golebski K. New insights into the function, development, and plasticity of type 2 innate lymphoid cells. *Immunol Rev. nov* 2018;286(1):74-85.
34. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol. janv* 2015;16(1):45-56.
35. Caminati M, Pham DL, Bagnasco D, Canonica GW. Type 2 immunity in asthma. *World Allergy Organ J. 2018;11(1):13.*
36. Kim B, Lee H-J, Im N-R, Lee DY, Kim HK, Kang CY, et al. Decreased expression of CCL17 in the disrupted nasal polyp epithelium and its regulation by IL-4 and IL-5. *PLoS One. 2018;13(5):e0197355.*
37. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity. févr* 2000;12(2):121-7.
38. Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y. Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv Immunol. 1994;57:145-90.*
39. Ishitoya J, Sakuma Y, Tsukuda M. Eosinophilic chronic rhinosinusitis in Japan. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol. sept* 2010;59(3):239-45.
40. Toba K, Koike T, Shibata A, Hashimoto S, Takahashi M, Masuko M, et al. Novel technique for the direct flow cytometric analysis of human basophils in unseparated blood and bone marrow, and the characterization of phenotype and peroxidase of human basophils. *Cytometry. 1 mars* 1999;35(3):249-59.

41. Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell*. 20 sept 1991;66(6):1175-84.
42. Elena-Pérez S, Heredero-Jung DH, García-Sánchez A, Estravís M, Martín MJ, Ramos-González J, et al. Molecular Analysis of IL-5 Receptor Subunit Alpha as a Possible Pharmacogenetic Biomarker in Asthma. *Front Med*. 2020;7:624576.
43. Stevens WW, Schleimer RP, Kern RC. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *J Allergy Clin Immunol Pract*. août 2016;4(4):565-72.
44. Wang X, Zhang N, Bo M, Holtappels G, Zheng M, Lou H, et al. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J Allergy Clin Immunol*. nov 2016;138(5):1344-53.
45. Nagase H, Ueki S, Fujieda S. The roles of IL-5 and anti-IL-5 treatment in eosinophilic diseases: Asthma, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol*. avr 2020;69(2):178-86.
46. Ghazi A, Trikha A, Calhoun WJ. Benralizumab--a humanized mAb to IL-5R $\alpha$  with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity--a novel approach for the treatment of asthma. *Expert Opin Biol Ther*. janv 2012;12(1):113-8.

## Annexe 2



## **DUPILUMAB PROJECT - SANOFI**

Pre-clinical study : nasal polyposis pathogenesis section  
*In vitro* study of the effect of pro-inflammatory Th2 environment , IL-4, IL-13  
and Dupilumab on human nasal respiratory epithelium

### **Scientific board:**

**Mr Bruno Louis (PhD) & Marcel Filoche, Directeurs Equipe 13 U955**

**Pr André Coste (MD, PhD), Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil,**

**Dr Sophie Bartier (MD), Henri Mondor Hospital**

**Dr Emilie Bequignon (MD, PhD), Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil**

**Dr Maxime Fieux (MD), CCA Hospice Civils de Lyon**

**Dr Valérie Gouilleux (MD, PhD), Equipe FRAME Tours**

**Mme Jennifer Pasquier (MD, PhD)**

### **Laboratory**

**Team : Biomécanique & appareil respiratoire, E13, UMR955 (IMRB institut médical de recherche biomédicale)**

**Head of staff : Bruno Louis et Marcel Filoche**

**University : Inserm, Université Paris Est Créteil (UPEC), Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB) UMR 955**

**Secondary affiliations : CNRS ERL 7000**

**Adress : 8 , rue du Général Sarrail, 94010 Créteil**

**Lieu-dit : Faculté de Santé - UPEC.**

**E-mail : [bruno.louis@inserm.fr](mailto:bruno.louis@inserm.fr)**

**Phone number : 0634173711**

## Annexe 2

<b>FUNDING</b>	SANOFI
<b>LOCATION OF LABORATORY/ SCIENCE KNOWLEDGE</b>	The team « Biomécanique et Appareil Respiratoire » labelled Inserm UMR 955 and CNRS ERL 7000 at Biomedical Research Mondor Institute (Créteil) developed 20 years ago a model of primary culture of human nasal epithelial cells (HNECs) (cells are collected during surgery for nasal polyps) and has a very strong expertise in biomechanic of respiratory cells (rigidity of the cytoskeleton, epithelial barrier permeability, adhesion properties, tight junctions, ciliary functions).
<b>INSTITUTIONS INVOLVED</b>	CHIC: Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil IMRB: Institut Mondor de Recherche Biomédicale AP-HP: Assistance Publique des Hôpitaux de Paris Hôpital Kremlin Bicêtre et Hôpital Henri Mondor HCL: Hospices Civils de Lyon Centre Hospitalier Lyon Sud
<b>BACKGROUND</b>	<p><b>1) Epidemiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP)</b></p> <p>Primary nasal polyposis, also called chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), is a common disease that affects 4% of the population. Symptoms related to growth of polyps within the sinonasal cavities include hyposmia, nasal congestion and discharge and facial pain. The age of discovery of the disease is between 40 and 50 years old. CRSwNP may be associated with asthma (30 to 40% of cases), or aspirin intolerance (15% of cases).</p> <p>Endoscopic examination shows the presence of nasal polyps in both nasal fossa although they may be asymmetric in size. The functional impact of CRSwNP is major and can significantly alter the quality of life of patients (Mortuaire, Vandeville, and Chevalier 2010). Medical treatment is always recommended by most guidelines including intranasal glucocorticoids and saline irrigations (Chong et al. 2016). In patients with severe symptoms or in whom initial treatment has failed to achieve adequate control, a short course of oral glucocorticoids may be considered. A Cochrane review showed a short-term benefit of a short course of systemic corticosteroids as compared with placebo or no treatment. (Head et al. 2016). Endoscopic sinus surgery is usually proposed to patients who still have severe symptoms despite an adequate medical treatment or who require repeated oral steroids (&gt;3 weeks per year). Surgery aims to remove polyps as well as to improve access to ongoing topical therapy. However, after surgery, 40% of patients present a recurrence of polyps at 18 months (DeConde et al. 2017) and 20% of patients require revision surgery at 5 years (Hopkins et al. 2009). CRSwNP is characterized by persistent mucosal inflammation which is a result of inappropriate or excessive immune response to various aggressions. Monoclonal antibodies that directly target the inflammatory pathway have been suggested as a new therapy for CRSwNP. They have been used to treat various diseases such as cancer, autoimmune diseases, or infectious diseases (Chari, Miller, and Widdison 2014) for several years and some molecules have been tested in CRSwNP (Bachert et al. 2016). Very recently, Bachert C. et al. have demonstrated the efficacy of Dupilumab by subcutaneous route on the overall symptomatology, in particular nasal blockage and quality of life, endoscopic and radiological scores (therapeutic protocol: one injection every 2 weeks for 52 weeks) with good tolerance (Bachert et al. 2019; 2020).</p>

**2) Pathophysiology of CRSwNP**

Despite recent advances in the description of cellular and molecular mechanisms involved in CRSwNP, the epithelial and inflammatory processes leading to nasal polyp (NP) growth are still to be better characterized (Soyka et al. 2012). Amongst CRS inflammatory phenotypes, a T-helper (Th)1-predominant pattern of cytokines is typically encountered in infectious rhinosinusitis, whereas a Th2 pattern is observed in allergic and eosinophilic sinonasal inflammation (Riechelmann et al. 2005; Van Zele et al. 2006). Th-2 mediators including interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-13 and increased concentrations of IgE, has been reported in the NPs of 85% of patients with CRSwNP in western countries (Van Bruaene et al. 2008). On the other hand, 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 (Wladislavosky-Waserman et al. 1984; Coste, Rateau, et al. 1996; Coste, Wang, et al. 1996; Pothoven et al. 2015). A recent review describes how dysfunction of the airway epithelium contributes to the pathogenesis of CRSwNP and suggests that mucociliary clearance (Wynne, Atkinson et al. 2019) and epithelial barrier function (Soyka et al. 2012) could be altered in NPs. Furthermore, dysregulation of epithelial wound repair with an inability to obtain ad integrum repair of the nasal airway epithelium has been described in NPs (Danielsen, Tynning et al. 2006). Indeed, epithelial wound repair characterized by basal cell (BC) spreading and migration, followed by proliferation and differentiation, is an important process to rapidly restore epithelial barrier integrity (Puchelle et al. 2006). Persistent epithelial barrier dysfunction may lead to aberrant airway remodelling including epithelial cell shedding and BC and mucous cell hyperplasia (Lloyd et Robinson 2007; Puchelle et al. 2006). It has been suggested that an ineffective Th1-based local immune response combined with increased Th2 cytokine activity contributes to an increased presence of eosinophils, which then lead to the formation of new polyps (Ramanathan et al. 2008).

**3) IL-4, IL-13 and CRSwNP**

Numerous cytokines are involved in this Th2-predominant type of inflammation, such as IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 or IL-13. Among them, IL-4/IL-13 are considered as key cytokines in the genesis of CRSwNP due to their role in tissue eosinophilia but their effects on epithelium in CRSwNP remain poorly understood. In animal models of asthma, interleukin-13 (IL-13) induces goblet cell metaplasia, eosinophil infiltration of the bronchial mucosa, and bronchial hyperreactivity. IL-4 is overexpressed in NP and stimulates the differentiation of naïve Th0 lymphocytes into differentiated Th2 lymphocytes and prevents apoptosis of activated T cells. IL-4 enables the activation of B-cells and the production of immunoglobulins (Ig). IL-4 also promotes eosinophil migration through increased expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 on human endothelial cells, and through the release the chemokine MCP-4 (CCL13), an important chemoattractant for eosinophils. IL-4 contributes therefore to eosinophilic infiltrates in NPs. IL-13 is a pleiotropic cytokine associated with the development of NPs and can initiate the recruitment of inflammatory cells, the differentiation of monocytes into macrophages, and the activation of eosinophils. IL-4 and IL-13 signal through two different but overlapping receptors, each containing an alpha subunit of the IL-4 receptor (IL-4R  $\alpha$ ) (Izuhara, Arima, et Yasunaga 2002; Ordovas-Montanes et al. 2018).

The type I receptor, activated only by IL-4, is located predominantly on lymphocytes and controls Th2-cell differentiation. The type II receptor, activated by IL-4 and IL-13, is expressed widely across resident and myeloid cells (Wills-Karp et Finkelman 2008). Thus, antibodies targeting IL-4R $\alpha$  could potentially inhibit downstream pathways engaged by both cytokines.

**4) Human nasal epithelial cells (HNEC) from primary culture model in air-liquid interface (ALI)**

HNECs are obtained from NPs tissue removed during sinus surgery, usually eliminated as surgical waste . Approval from the ethic committee of Ile de France X was obtained in Créteil for research use of surgical waste (CPP IDF X 2016-01-01). After an enzymatic digestion, cells are plated in inserts and then placed in air/liquid interface (ALI) after 24 hours. 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 (Papon et al. 2002). Culture medium (Stemcell, Pneumacult -ALI medium) is changed daily, and the HNECs reach a stable differentiated state with the detection of ciliated, secretory, and basal cells during the third week of culture (Day 21) (Cao et al. 2018). The ALI allows polarization of the epithelium (i.e., apical surface exposed to air and basal layer in contact with culture medium) close to *in vivo* situation in the nose. This ALI model of differentiated HNECs therefore closely mimics *in vivo* conditions, except that they are not in their natural environment, away from the potential inflammatory process occurring in the nasal cavity (Papon et al. 2002). It constitutes an excellent tool to study cellular and molecular mechanisms involving airway epithelial cells exposed to various stimuli (Cao et al. 2018; Secondo, Liu, et Lewinski 2017). This model is therefore highly suitable for the study of IL effects on epithelial airway repair and ciliary beating. This model is also useful to create a specific inflammatory environment, e.g. by adding IL-4 or IL-13 to the culture medium (Everman, Rios, et Seibold 2018).

**4) IL-4, IL-13 and HNEC**

*In vitro* , IL-13 downregulates number of ciliated cells while increasing number of goblet cells proportion, and also disrupts intercellular contact (Laoukili et al. 2001; Kuperman et al. 2002). IL-13 also decreases ciliary beat frequency in a time- and dose-dependent manner (Laoukili et al. 2001). Furthermore, IL-4 and IL-13 alter intercellular junctions with a decrease in the transepithelial electric resistance (TEER) of HNEC cultures and an increase in cell permeability (Wise et al. 2014) and have been shown to downregulate junction proteins expression such as ZO-1 and occludin (Ahdieh, Vandenbos, et Youakim 2001; Lee et al. 2019). In the same way, IL-4/IL-13 induce an increase in mucin production and mucus thickness (Sharba et al. 2019), IL-13 upregulates MUC5AC but not MUC2 (Zuhdi Alimam et al. 2000) while IL-4 upregulates MUC2 but not MUC5AC (Dabbagh et al. 1999). IL-4 and IL-13 exposure also results in decreased epithelial migration (Ahdieh, Vandenbos, et Youakim 2001). All these results suggest that the alteration of nasal epithelial barrier could be a crucial step in NP pathogenesis (Norlander. 1996) and could modify interactions between external environment, epithelial cells and local immune and inflammatory cells.

	<p><b>5) Dupilumab and HNEC</b></p> <p>IL-4 and IL-13 bind to receptors composed of various combinations of four receptor subunits: IL-4R<math>\alpha</math>, IL-13R<math>\alpha</math>1, IL-13R<math>\alpha</math>2 and the common <math>\gamma</math>-chain. The type I IL-4R, a heterodimer of IL-4R<math>\alpha</math> and the common <math>\gamma</math>-chain, mediates IL-4-dependent activation of the transcription factor STAT6 in hematopoietic cells and is thus mostly responsible for the population expansion of CD4+ TH2 cells. The type II IL-4R, a heterodimer of IL-4R<math>\alpha</math> and IL-13R<math>\alpha</math>1 chains, can bind to both IL-4 and IL-13. It is thought to be the main route by which nonhematopoietic cells respond to these cytokines. Finally, the IL-13R<math>\alpha</math>2 chain binds IL-13 with high affinity and functions as a 'decoy receptor', although a report has suggested it can also show STAT6-independent signaling activity (Ramalingam et al. 2008). HNEC have been show to express IL-4R<math>\alpha</math> and IL-13R<math>\alpha</math>1 (Akaiwa et al. 2001; Lee et al. 2019; Laoukili et al. 2001).</p> <p>Dupilumab is a fully human monoclonal antibody to the IL-4R<math>\alpha</math>, which inhibits signaling of IL-4 and IL-13, two cytokines central to type 2 helper T-cell-mediated inflammation. Their safety and efficacy have been proven in randomized clinical trials in adults with persistent asthma and elevated eosinophil levels (Wenzel et al. 2013) as well as in adults with CRSwNP (Bachert et al. 2019; 2020). Dupilumab reduces symptoms burden, frequency of exacerbations, beta-agonist use over time, nasal polyps volumes, corticosteroid use and improves lung function, as well as the quality of life. On the plasmatic level, Dupilumab decreases eotaxin-3 levels and IgE level. Surprisingly, no decrease of eosinophil levels was observed (Wenzel et al. 2013). Data from different studies suggest that blocking both cytokines may be more efficient than targeting either alone (Wenzel et al. 2013; Corren et al. 2010; Borish et al. 2001).</p>
--	--

## Annexe 2

<p><b><u>STUDY HYPOTHESIS</u></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IL-4 and IL-13 seems to have a direct impact on nasal epithelium : These cytokines alter mucociliary clearance and epithelial barrier integrity while increasing epithelial permeability in HNEC cultures.</li> <li>- The presence of IL-4 and IL-13 receptors in bronchial epithelial cells have been demonstrated <i>in vivo and in vitro</i>.</li> <li>- IL-4 and IL-13 receptors could also be expressed at the surface of HNEC.</li> <li>- Dupilumab is an IgG4 anti- IL-4 and IL-13 common <math>\alpha</math> subunit receptor.</li> <li>- IL-4 and IL-13 deleterious effects on nasal epithelium functions (barrier integrity and mucociliary clearance) could be antagonized by dupilumab.</li> <li>- The restoration of barrier integrity and mucociliary clearance after epithelial injury represent a key step in the defense capacity of the airway epithelium.</li> <li>- In CRSwNP, dupilumab could have a direct effect in human nasal epithelium reinforcing its therapeutic impact.</li> </ul>
<p><b><u>MAIN OBJECTIVE</u></b></p>	<p>The main objective is to evaluate the <i>in vitro</i> effect of IL-4, IL-13, and Dupilumab on human nasal epithelium barrier function.</p>
<p><b><u>SECONDARY OBJECTIVES</u></b></p>	<p>Our secondary objectives are :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- To demonstrate the presence of the IL-4R<math>\alpha</math> subunit (transmembrane protein) and its potential location at the apical and basolateral part of HNEC.</li> <li>- To evaluate the <i>in vitro</i> effect of IL-4, IL-13, and Dupilumab on human nasal epithelium ciliary beating an ultrastructure.</li> <li>- To evaluate the <i>in vitro</i> effect of IL-4, IL-13, and Dupilumab on human nasal epithelial barrier integrity and differentiation</li> <li>- To evaluate the <i>in vitro</i> effect of IL-4, IL-13, and Dupilumab on human nasal epithelial repair mechanism.</li> </ul>
<p><b><u>MATERIAL</u></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- HNEC are isolated from surgical waste during sinonasal surgery for CRSwNP. in the ENT Department of Pr. Coste at the Intercommunal Hospital Of Creteil. the study was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01) . primary culture are performed at air-liquid interface. The HNECs reached a stable differentiated state with the detection of ciliated, secretory, and basal cells during the third week of culture (Day 21).</li> </ul>
<p>METHODS</p>	<p><b><u>STEP 1 : Primary Cultures of Human Nasal Epithelial Cells (HNEC)</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-i) Transport of surgical waste collected in the operating room in Dulbecco`s modified Eagles Medium (DMEM/F-12 medium (1:1), Invitrogen) with antibiotics at 4°C, as soon as possible to the lab for immediate culture.</li> <li>-Purification by enzymatic degradation (Pronase, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)</li> <li>-Seeding : HNEC culture system is composed of 1 cm<sup>2</sup> diameter filters mounted on inserts (Transwell®), each placed on a 12-well plate. These filters are covered with a thin layer of collagen.</li> </ul> <div data-bbox="434 1637 1311 1879" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Air/liquid interface after 24 hours of seeding</li> <li>-Quality control of cultures by measuring the transepithelial electric resistance (TEER) with an EVOM 3 (World Precision Instruments, Astonbury, UK) microvoltmeter.</li> </ul>

- 21 days of culture prior to obtain well differentiated HNECs. 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

**STEP 2: IN VITRO STUDY OF IL-4, IL-13 AND DUPILUMAB EFFECTS IN HUMAN NASAL EPITHELIAL CELLS**

***1) Effects of IL-4, IL-13 and Dupilumab on IL-4R $\alpha$  common subunit expression.***

We will evaluate whether IL-4 and IL-13 are able to induce IL-4R $\alpha$  expression (upregulation loop in HNEC ?, Dabbagh et al. 1999). IL-4R $\alpha$  expression will be characterized by immunofluorescence and Western blot analysis. The effects of dupilumab on IL-4R $\alpha$  expression with or without presence of IL-4/IL-13 will also be evaluated.

***2) Effects of IL-4, IL-13 and Dupilumab according to the dose***

We will evaluate the quantitative variations of Dupilumab in the apical and basal sides of the inserts (upper or lower chambers) depending on the dose administered at the apical or basolateral sides of the inserts and on the presence of IL-4/IL-13. Quantification will be performed by ELISA and Western Blot.

***3) Effects of IL-4, IL-13 and Dupilumab on ciliary beating and ultrastructure***

Ciliary beating will be measured by high-speed video microscopy (HSVM) allowing to measure ciliary beat frequency (CBF), relative ciliary density, cilia length and metachronal wavelength and the ciliary beating efficiency index. Ciliary ultrastructure will be characterized using electronic microscopy. We will evaluate all these parameters with or without IL-4, IL-13 and dupilumab.

***4) Effects of IL-4, IL-13 and Dupilumab on the rheological properties of epithelial mucus using a viscometer***

Mucous layer at the surface of HNEC cultures will be sampled and its viscosity measured with a viscometer. We will evaluate the parameters with or without IL-4, IL-13 and dupilumab.

***5) Effects of IL-4, IL-13 and Dupilumab on cell viability and epithelial permeability***

Viability of HNEC will be assessed by MTT testing. Permeability will be measured by trans-epithelial electrical resistance measurements using an EVOM 3 microvoltmeter. Performing immunolabelling of Occludin and Zona-occludens1 proteins in HNEC will allow us to characterize effects on tight junctions.

***6) Effects of IL-4, IL-13 and Dupilumab on epithelial differentiation***

Cell differentiation will be evaluated by immunofluorescence using mouse monoclonal anti-cytokeratin 14 (basal cell marker), mouse monoclonal anti-mucin-5AC (goblet cell marker), and mouse monoclonal anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin (ciliated cell marker).

***7) Effects of IL-4, IL-13 and Dupilumab on epithelial cell repair : mechanical***

## Annexe 2

	<p><b><i>injury model in HNECs primary culture.</i></b></p> <p>The <i>in vitro</i> wound repair assay will be carried out according to a model of mechanical injury adapted from a previously described method on fully differentiated cultures of HNECs (Lechapt-Zalcman et al. 2006). We will perform 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 will be 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 will then be quantified by image analysis software. Wound closure will be 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 will be evaluated by comparing the initial wound area of each tested condition. The effects of IL-4, IL-13 and dupilumab on epithelial wound repair and epithelial cells differentiation after wound closure will be characterized.</p>
<b><u>FAISABILITY</u></b>	<p>We estimate at 50 cultures from 50 different patients, the amount of material necessary for the present project.</p> <p>-Surgical recruitment at the CHIC easily cover primary culture needs for this study (at least 3 patients operated each week).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Experience of the lab regarding themes and methods.</li> <li>- Availability of a full-time PhD Student 2021-2022, part-time 2022-2023</li> <li>- Availability of a full-time master student</li> </ul>
<b><u>STUDY CALENDAR</u></b>	<p>Protocol writing: 1 month          Experiments: 18 months          Writing results: 6 months</p>
<b><u>COST ESTIMATION</u></b>	<p>Culture of HNEC for 24 months: 30000 euros          EVOM : 3000 euros          Viscometer : 3000 euros          Automatic epithelial wound : 3000 euros          Anti-FcRn antibodies : 3000 euros          Anti-IL-6 antibody (ab) : 1500 euros          Antibodies for immunofluorescence : 1500 euros          Anti-ZO-1 and anti-ZO-3 ab : 2500 euros          Dupilumab: supplied by the industrial partner          Anti-Dupilumab ab : 3000 euros          Kit ELISA Dupilumab : 10000 euros          Anti-IL-4Ra fluorescent mouse ab (Immunotech, Marseille, France): 3000 euros          Anti-IL-4R<math>\alpha</math> common subunit ab: 3000 euros          IL-4 and IL-13: 5000 euros          Anti-Cytokeratin 14 ab + Anti-MUC5AC ab + Anti-<math>\alpha</math> tubulin ab : 4000 euros          Infrastructure costs: 10% of the total cost          Total cost: 81000 euros</p>

## Annexe 3



## Score SNOT-22

Figure issue de Hopkins C, Gillett S, Slack R, Lund VJ, Browne JP. Psychometric validity of the 22-item Sinonasal Outcome Test. Clin Otolaryngol. oct 2009;34(5):447-54.

### Sino-Nasal Outcome Test-22 (Test d'impact des symptômes sino-nasaux-22)

Vous trouverez ci-dessous une liste de symptômes et de conséquences sociales et/ou émotionnelles liées à votre pathologie nasale. Nous aimerions en apprendre davantage sur ces problèmes et apprécierions que vous répondiez aux questions suivantes au meilleur de vos capacités. Il n'y a pas de bonnes ou de mauvaises réponses et vous seul(e) pouvez nous donner ces informations. Veuillez évaluer vos problèmes, tels qu'ils se sont présentés durant les deux dernières semaines. Nous vous remercions pour votre participation

En considérant la sévérité du problème quand il survient et la fréquence avec laquelle il survient, veuillez coter chaque item ci-dessous en **entourant** le chiffre qui correspond à votre ressenti, en utilisant l'échelle suivante →

	Aucun problème	Problème très léger	Problème léger	Problème modéré	Problème sévère	Problème très sévère
1. Besoin de se moucher	0	1	2	3	4	5
2. Eternuements	0	1	2	3	4	5
3. Nez qui coule	0	1	2	3	4	5
4. Toux	0	1	2	3	4	5
5. Ecoulement nasal postérieur (dans la gorge)	0	1	2	3	4	5
6. Ecoulement nasal épais	0	1	2	3	4	5
7. Oreilles bouchées	0	1	2	3	4	5
8. Vertiges	0	1	2	3	4	5
9. Douleur/pression dans l'oreille	0	1	2	3	4	5
10. Douleur/pression faciale	0	1	2	3	4	5
11. Difficulté pour s'endormir	0	1	2	3	4	5
12. Se réveiller la nuit	0	1	2	3	4	5
13. Manque d'une bonne nuit de sommeil (mauvaise qualité de sommeil)	0	1	2	3	4	5
14. Se réveiller fatigué	0	1	2	3	4	5
15. Fatigue (durant la journée)	0	1	2	3	4	5
16. Baisse de productivité (rendement, efficacité)	0	1	2	3	4	5
17. Baisse de concentration	0	1	2	3	4	5
18. Frustration/agitation/irritabilité	0	1	2	3	4	5
19. Baisse de moral (tristesse)	0	1	2	3	4	5
20. Gêne/inconfort	0	1	2	3	4	5
21. Perturbation du goût, de l'odorat	0	1	2	3	4	5
22. Obstruction/congestion nasale	0	1	2	3	4	5

TOTAL: \_\_\_\_\_

TOTAL GÉNÉRAL : \_\_\_\_\_



## Annexe 4



## Stade de sévérité de l'asthme

	Symptômes/Jour	Symptômes/Nuit	PEF ou FEV1	PEF variabilité
<b>Stade 1</b> <b>Intermittent</b>	< 1 fois par semaine  Asymptomatique et PEF normal entre les crises	< / = 2 fois par mois	> / = 80%	< 20%
<b>Stade 2</b> <b>Persistent Léger</b>	> 1 fois par semaine mais < 1 fois par jour  Les crises peuvent influencer l'activité physique	> 2 fois par mois	> / = 80%	20-30%
<b>Stade 3</b> <b>Persistent Modéré</b>	Tous les jours  Les crises ont une influence sur l'activité physique	> 1 fois par semaine	60%-80%	> 30%
<b>Stade 4</b> <b>Persistent Sévère</b>	Continue  Activité physique limitée	Fréquemment	< / = 60%	> 30%

<https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/09/WMS-French-Pocket-Guide-GINA-2016.pdf>

## Test de Contrôle de l'Asthme (ACT)

Test de Contrôle de l'Asthme (ACT)					
Score = 1	Score = 2	Score = 3	Score = 4	Score = 5	
1. au cours des <b>4 dernières semaines</b> , votre asthme vous a-t-il empêché(e) de faire vos activités au travail, à l'école / université ou chez vous ?					
<input type="radio"/> Tout le temps	<input type="radio"/> La plupart du temps	<input type="radio"/> Quelques fois	<input type="radio"/> Rarement	<input type="radio"/> Jamais	Score : .....
2. Au cours des <b>4 dernières semaines</b> , avez-vous été essoufflé(e) ?					
<input type="radio"/> Plus d'1 fois par jour	<input type="radio"/> 1 fois par jour	<input type="radio"/> 3 à 6 fois par semaine	<input type="radio"/> 1 ou 2 fois par semaine	<input type="radio"/> Jamais	Score : .....
3. Au cours des <b>4 dernières semaines</b> , les symptômes de l'asthme (sifflements dans la poitrine, toux, essoufflement, oppression ou douleur dans la poitrine) vous ont-ils réveillé(e) la nuit ou plus tôt que d'habitude le matin ?					
<input type="radio"/> 4 nuits ou plus par semaine	<input type="radio"/> 2 à 3 nuits par semaine	<input type="radio"/> 1 nuit par semaine	<input type="radio"/> Juste 1 ou 2 fois	<input type="radio"/> Jamais	Score : .....
4. Au cours des <b>4 dernières semaine</b> , combien de fois avez-vous utilisé votre inhalateur / aérosol-doseur de secours ?					
<input type="radio"/> 3 fois par jour ou plus	<input type="radio"/> 1 à 2 fois par jour	<input type="radio"/> 2 à 3 fois par semaine	<input type="radio"/> 1 fois par semaine ou moins	<input type="radio"/> Jamais	Score : .....
5. Comment évalueriez-vous votre maîtrise de l'asthme au cours des <b>4 dernières semaines</b> ?					
<input type="radio"/> Pas maîtrisé du tout	<input type="radio"/> Très peu maîtrisé	<input type="radio"/> Un peu maîtrisé	<input type="radio"/> Bien maîtrisé	<input type="radio"/> Totalement maîtrisé	Score : .....

*Test de Contrôle de l'Asthme (www.asthmacontroltest.com)*

<https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/09/WMS-French-Pocket-Guide-GINA-2016.pdf>

# Annexe 5



## Annexe 5

CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

### ETUDE PSI – Mise au point du Polyps Severity Index (PSI) – CRF

#### Critères d'inclusion

Critères d'inclusion	Oui	Non
1. Age $\geq$ à 18 ans	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Affilié à la sécurité sociale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Information et non opposition	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Patient diagnostiqué pour une polypose nasosinusienne	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Si l'un de critère d'inclusion est coché « Non », le patient est NON ELIGIBLE**

Critères de non inclusion	Oui	Non
1. Refus de participer à l'étude	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Personne ne parlant ou ne comprenant pas le français	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Antécédent de chirurgie de la base du crâne pour tumeurs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Antécédent de traumatisme crânio-facial majeur	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Antécédent de radiothérapie cérébro-faciale ou chimiothérapie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Antécédent de pathologie neurologique inflammatoire ou neurodégénérative	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Maladie de système associé à la présence de polypes sinusiens (Granulomatose avec polyangéite, Mucoviscidose, dyskinésie ciliaire primitive, déficit immunitaire)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Cancer ou hémopathie en cours d'évolution	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Si l'un des critères de non-inclusion est coché « Oui », le patient est NON ELIGIBLE**

#### INFORMATIONS POUR LE PATIENT

Nous allons vous POSER DES QUESTIONS afin de recueillir des informations en lien avec la polypose nasosinusienne. Répondez librement en fonction de votre état actuel.

#### IDENTIFICATION PATIENT

Initiale du Nom : \_\_                      Initiale du Prénom : \_\_                      Sexe :   
Féminin ou  Masculin  
Age |\_\_|\_|\_| (année)  
Date d'inclusion : |\_\_|\_| (jour) |\_\_|\_| (mois) |\_\_|\_|\_|\_| (année)  
Date du diagnostic de PNS : |\_\_|\_|\_|\_| (année)

**CENTRE d'inclusion=** |\_\_\_\_\_|

CENTRE 1= Service ORL Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil (Pr. Coste, Dr. Bequignon)

CENTRE 2= Service ORL CHU de Lille (Pr. Mortuaire)

CENTRE 3= Service ORL de l'hôpital Kremlin Bicêtre (Pr. Papon)

CENTRE 4 = Service ORL CHU de la Conception (Pr. Michel)

CENTRE 5= Service ORL CHU de Lyon Sud (Pr. Tringali, Dr. Fieux)

CENTRE 6= Service ORL de l'Hôpital de la Croix Rousse (Dr. Daveau)

CENTRE 7= Service ORL de l'hôpital Henri Mondor (Dr. Bartier)

CENTRE 8= Service ORL de l'hôpital Lariboisière (Dr. Vérillaud)

## Annexe 5

CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

### TERRAIN

Poids et Taille Poids | | | | kg Taille | | , | | | m

### TERRAIN

#### Comorbidités

Atopique  Asthmatique  SAOS   
 Intolérant Aspirine  Otite séro-muqueuse  RGO   
 Intolérant Sulfites  Syndrome de Widal  Tabac: Non  Actif  Passif  Sevré

#### Antécédents ORL

- Avez-vous déjà été opéré des sinus ?  Oui  Non
- Si oui, nombre de chirurgies | | | |
- Si oui, année/chirurgie | | | | ; | | | | ; | | | | ; | | | | ; | | | | ; | | | |
- Si oui, quelle chirurgie et combien fois chacune ?  
 Fonctionnelle/Limitée  | | | | ET/OU Radicale/Etendue  | | | |

#### Si patient asthmatique, complétez

- Date du diagnostic : | | | | | (année) → Asthme Allergique  Non Allergique  ND
- Citez parmi les symptômes suivants ceux associés à votre asthme ?  
 Dyspnée  Oppression thoracique  Toux  Sifflements respiratoires
- Sévérité de l'asthme ? (si connu par le patient ou accessible sur ses EFR, cochez juste le stade)

ND <input type="checkbox"/>	Symptômes/Jour	Symptômes/Nuit	DEP (Flux expiratoire max)	DEP variabilité
Stade 1 <input type="checkbox"/>	<1/semaine	<2/mois	>80%	<20%
Stade 2 <input type="checkbox"/>	>1/semaine	>2/mois	>80%	20-30%
Stade 3 <input type="checkbox"/>	Tous les jours	>1/semaine	60-80%	>30%
Stade 4 <input type="checkbox"/>	Continue	Fréquemment	<60%	>30%

### SIGNES CLINIQUES

#### Symptômes (dans les 4 dernières semaines)

**Intensité des symptômes rhinosinusiens** : 0 = 0/10 ; 1= 1-3/10 ; 2=EVA 3-7/10 ; 3= EVA>7/10

Rhinorrhée antérieure :  0 si absent  1 si léger  2 si modéré  3 si sévère  
 Rhinorrhée postérieure :  0  1  2  3  
 Obstruction nasale :  0  1  2  3  
 Douleurs sinusiennes :  0  1  2  3  
 Troubles de l'odorat :  0  1  2  3  
 Troubles du sommeil :  0  1  2  3

**Fréquence des symptômes rhinosinusiens** : 3= Tous les J ; 2= <1fois/J ; 1= <1fois par/S, 0 = jamais  
 Si vous avez coché 0 en intensité, vous pouvez directement cochez 0 à la fréquence pour l'item.

Rhinorrhée antérieure :  0 jamais  1 <1fois par/S  2 <1fois/J  3 Tous les J  
 Rhinorrhée postérieure :  0  1  2  3  
 Obstruction nasale :  0  1  2  3  
 Douleurs sinusiennes :  0  1  2  3  
 Troubles de l'odorat :  0  1  2  3  
 Troubles du sommeil :  0  1  2  3

## Annexe 5

CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

<b>Autres symptômes</b>	
<u>Dysgueusie</u> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
→ Si oui :	
- Arrivez-vous à reconnaître :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
• Le goût salé ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
• Le goût sucré ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
• Le goût amer ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
• Le goût acide	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non

### Examen clinique

<u>Otoscopie : otite séromuqueuse ?</u>	
Oreille droite : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Oreille gauche : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b><u>Nasofibroscopie : si présence de polypes, score de LIDHOLT ?</u></b>	
<u>Fosse nasale DROITE</u>	<u>Fosse nasale GAUCHE</u>
<input type="checkbox"/> 0 si pas de polypes	<input type="checkbox"/> 0
<input type="checkbox"/> 1 si polypes méat moyen	<input type="checkbox"/> 1
<input type="checkbox"/> 2 si polypes atteignant le CM sans dépasser son bord inférieur	<input type="checkbox"/> 2
<input type="checkbox"/> 3 si polypes dépassant le bord inférieur du CM	<input type="checkbox"/> 3
<input type="checkbox"/> 4 si polypes touchant le plancher de la FN	<input type="checkbox"/> 4

### Examens complémentaires

<b>TDM (dernier réalisé) Date:</b> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (jour) <input type="text"/> <input type="text"/> (mois) <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (année)	
Score de LundMcKay: 0 si pas comblé ; 1/2 si partiellement comblé ; 2/2 si comblé totalement	
<b>A DROITE</b>	<b>A GAUCHE</b>
Méat Moyen <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	Méat Moyen <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
Sinus Maxillaire <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	Sinus Maxillaire <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
Ethmoïde antérieur <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	Ethmoïde antérieur <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
Ethmoïde postérieur <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	Ethmoïde postérieur <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
Sinus frontal <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	Sinus frontal <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
Sinus sphénoïdal <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	Sinus sphénoïdal <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2

<b>Biologie (prescrit si non disponible) Date:</b> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (jour) <input type="text"/> <input type="text"/> (mois) <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> (année)	
<u>NFS : Eosinophilie sanguine :</u> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> éléments/mm <sup>3</sup> (G/L)	<u>Dosage pondéral des IgE totales :</u> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> UI/mL (kUI/L)

Annexe 5

CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

**Traitements reçus pour la polypose nasosinusienne**

**Traitement local**

<p><b><u>Lavage de nez</u></b></p> <p><b>Contenu ?</b></p> <p><input type="checkbox"/> Sérum physiologique      <input type="checkbox"/> Sérum Hypertonique</p> <p><input type="checkbox"/> Reconstitution (Eau + gros sel)      <input type="checkbox"/> Autres</p> <p><input type="checkbox"/> Budésonide      <input type="checkbox"/> NaCl + Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup></p> <p><b>Fréquence ?</b></p> <p><input type="checkbox"/> &lt;1 fois par jour</p> <p><input type="checkbox"/> 1 fois/Jour</p> <p><input type="checkbox"/> 2 fois/Jour</p> <p><input type="checkbox"/> &gt;2fois/Jour</p>	<p><b><u>Corticothérapie en spray nasale</u></b></p> <p><b>Nom ?</b></p> <p><b>Fréquence ?</b></p> <p><input type="checkbox"/> &lt;1 pulv/narine/Jour</p> <p><input type="checkbox"/> 1 pulv/narine/Jour</p> <p><input type="checkbox"/> 2 pulv/narine/Jour</p> <p><input type="checkbox"/> 1 pulv/narine 2fois/Jour</p> <p><input type="checkbox"/> 2 pulv/narine 2fois/Jour</p> <p><b>Durée pour vider un flacon :</b>  __ __  semaines</p>
---	---

**Traitement par voie orale**

<p><b><u>Avez-vous reçu des corticoïdes par voie orale au cours de l'année ?</u></b>      <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p>	
<p><b>Si oui → Date de la dernière cure</b></p> <p>- Quelle dose cumulée annuelle ?</p> <p>- L'obstruction nasale s'améliore-t-elle pendant la cure ?</p> <p>    → Si oui, l'amélioration est-elle totale ?</p> <p>    → Si oui, l'amélioration dure combien de temps ?</p>	<p> __ __ / __ __ / __ __ __ </p> <p> __ __ __  mg/an</p> <p><input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p> <p> __ __  semaines postcure</p>
<p>- L'odorat s'améliore-t-il pendant la cure ?</p> <p>    → Si oui, l'amélioration est-elle totale ?</p> <p>    → Si oui, l'amélioration dure combien de temps ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p> <p><input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p> <p> __ __  semaines postcure</p>

**Traitement injectable**

<p><b>Biothérapies :</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p>	<p>→ Si oui, Nom de la molécule : .....</p> <p>→ Si oui, Date de début :  __ __ / __ __ / __ __ </p>
--	--

**Autres traitements**

<p>Anti-histaminiques      <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p>	<p>Eviction de l'allergène      <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p>
<p>Anti-reflux      <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p>	<p>Désensibilisation (ITA)      <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p>

## Annexe 5

CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

### ANNEXE 1 : SNOT-22

#### Sino-Nasal Outcome Test-22 (Test d'impact des symptômes sino-nasaux-22)

Vous trouverez ci-dessous une liste de symptômes et de conséquences sociales et/ou émotionnelles liées à votre pathologie nasale. Nous aimerions en apprendre davantage sur ces problèmes et apprécierions que vous répondiez aux questions suivantes au meilleur de vos capacités. Il n'y a pas de bonnes ou de mauvaises réponses et vous seul(e) pouvez nous donner ces informations. Veuillez évaluer vos problèmes, tels qu'ils se sont présentés durant les deux dernières semaines. Nous vous remercions pour votre participation

En considérant la sévérité du problème quand il survient et la fréquence avec laquelle il survient, veuillez coter chaque item ci-dessous en **entourant** le chiffre qui correspond à votre ressenti, en utilisant l'échelle suivante →

	Aucun problème	Problème très léger	Problème léger	Problème modéré	Problème sévère	Problème très sévère
1. Besoin de se moucher	0	1	2	3	4	5
2. Eternuements	0	1	2	3	4	5
3. Nez qui coule	0	1	2	3	4	5
4. Toux	0	1	2	3	4	5
5. Ecoulement nasal postérieur (dans la gorge)	0	1	2	3	4	5
6. Ecoulement nasal épais	0	1	2	3	4	5
7. Oreilles bouchées	0	1	2	3	4	5
8. Vertiges	0	1	2	3	4	5
9. Douleur/pression dans l'oreille	0	1	2	3	4	5
10. Douleur/pression faciale	0	1	2	3	4	5
11. Difficulté pour s'endormir	0	1	2	3	4	5
12. Se réveiller la nuit	0	1	2	3	4	5
13. Manque d'une bonne nuit de sommeil (mauvaise qualité de sommeil)	0	1	2	3	4	5
14. Se réveiller fatigué	0	1	2	3	4	5
15. Fatigue (durant la journée)	0	1	2	3	4	5
16. Baisse de productivité (rendement, efficacité)	0	1	2	3	4	5
17. Baisse de concentration	0	1	2	3	4	5
18. Frustration/agitation/irritabilité	0	1	2	3	4	5
19. Baisse de moral (tristesse)	0	1	2	3	4	5
20. Gêne/inconfort	0	1	2	3	4	5
21. Perturbation du goût, de l'odorat	0	1	2	3	4	5
22. Obstruction/congestion nasale	0	1	2	3	4	5

TOTAL: \_\_\_\_\_

TOTAL GÉNÉRAL : \_\_\_\_\_

## Annexe 5

### CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

Données à intégrer dans la database excel qui seront calculées à posteriori à partir des données du CRF.
IMC  _ _ _
EVA clinique intensité des symptômes .../18
Score de Lidholt .../8
Score de Lund Mc Kay .../24
SNOT-22 (Questionnaire en Annexe) ..../110

## Annexe 5

CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

### VISITE 2 - EVALUATION 3 MOIS APRES INCLUSION

Date de la visite 2 \_\_\_\_\_ (jour) \_\_\_\_\_ (mois) \_\_\_\_\_ (année)

AJOUT sur le E-CRF de : Avez-vous été opéré depuis la dernière fois ? OUI ou NON

Et si OUI : la DATE De la chirurgie

#### SIGNES CLINIQUES

Symptômes (dans les 4 dernières semaines)

**Intensité des symptômes rhinosinusiens** : 0 = 0/10 ; 1= 1-3/10 ; 2=EVA 3-7/10 ; 3= EVA>7/10

Rhinorrhée antérieure :	<input type="checkbox"/> 0 si absent	<input type="checkbox"/> 1 si léger	<input type="checkbox"/> 2 si modéré	<input type="checkbox"/> 3 si sévère
Rhinorrhée postérieure :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Obstruction nasale :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Douleurs sinusiennes :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Troubles de l'odorat :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Troubles du sommeil :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

**Fréquence des symptômes rhinosinusiens** : 3= Tous les J ; 2=<1fois/J ; 1=<1fois par/S, 0 = jamais

Si vous avez coché 0 en intensité, vous pouvez directement cochez 0 à la fréquence pour l'item.

Rhinorrhée antérieure :	<input type="checkbox"/> 0 jamais	<input type="checkbox"/> 1 <1fois par/S	<input type="checkbox"/> 2 <1fois/J	<input type="checkbox"/> 3 Tous les J
Rhinorrhée postérieure :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Obstruction nasale :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Douleurs sinusiennes :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Troubles de l'odorat :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
Troubles du sommeil :	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

#### Autres symptômes

Dysgueusie  Oui  Non

→ Si oui :

- Arrivez-vous à reconnaître :

- |                   |   |
|-------------------|---|
| • Le goût salé ?  | <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non |
| • Le goût sucré ? | <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non |
| • Le goût amer ?  | <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non |
| • Le goût acide   | <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non |

#### Examen clinique

Taille	Poids
Otoscopie : otite séromuqueuse ? Oreille droite : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	Oreille gauche : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>Nasofibroscopie : score de LIDHOLT ?</b> <u>Fosse nasale DROITE</u> <input type="checkbox"/> 0 si pas de polypes <input type="checkbox"/> 1 si polypes méat moyen <input type="checkbox"/> 2 si polypes atteignant le CM sans dépasser son bord inférieur <input type="checkbox"/> 3 si polypes dépassant le bord inférieur du CM <input type="checkbox"/> 4 si polypes touchant le plancher de la FN	<u>Fosse nasale GAUCHE</u> <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4

Annexe 5

CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

**Examens complémentaires**

**TDM (si 2<sup>ème</sup> réalisé, en + de celui à la V1) Date:**    (jour)   (mois)    (année)

Score de LundMcKay: 0 si pas comblé ; 1/2 si partiellement comblé ; 2/2 si comblé totalement

A DROITE			A GAUCHE				
Méat Moyen	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Méat Moyen	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Sinus Maxillaire	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Sinus Maxillaire	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Ethmoïde antérieur	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Ethmoïde antérieur	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Ethmoïde postérieur	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Ethmoïde postérieur	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Sinus frontal	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Sinus frontal	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Sinus sphénoïdal	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Sinus sphénoïdal	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2

**Biologie (si prescrit à la V1 car non disponible) Date:**    (jour)   (mois)    (année)

NFS : Eosinophilie sanguine : <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> éléments/mm <sup>3</sup> (G/L)	Dosage pondéral des IgE totales : <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> UI/mL (kUI/L)
---	--

**Traitements reçus pour la polypose nasosinusienne dans les 3 derniers mois**

**Traitement local**

<u>Lavage de nez</u>	<u>Corticothérapie nasale</u>
<b>Contenu ?</b>	<b>Nom ?</b>
<input type="checkbox"/> Sérum physiologique <input type="checkbox"/> Sérum Hypertonique	<b>Fréquence ?</b>
<input type="checkbox"/> Reconstitution (Eau + gros sel) <input type="checkbox"/> Autres	<input type="checkbox"/> <1 pulv/narine/Jour
<input type="checkbox"/> Budésonide <input type="checkbox"/> NaCl + Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup>	<input type="checkbox"/> 1 pulv/narine/Jour
<b>Fréquence ?</b>	<input type="checkbox"/> 2 pulv/narine/Jour
<input type="checkbox"/> <1 fois par jour	<input type="checkbox"/> 1 pulv/narine 2fois/Jour
<input type="checkbox"/> 1 fois/Jour	<input type="checkbox"/> 2 pulv/narine 2fois/Jour
<input type="checkbox"/> 2 fois/Jour	<b>Durée pour vider un flacon :</b> <input type="text"/> <input type="text"/> semaines
<input type="checkbox"/> >2fois/Jour	

**Traitement par voie orale**

<b>Avez-vous reçu des corticoïdes par voie orale dans les 3 derniers mois ?</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>Si oui → Date de la dernière cure</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
- Quelle dose cumulée annuelle ?	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> mg/an
- L'obstruction nasale s'améliore-t-elle pendant la cure ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
→ Si oui, l'amélioration est-elle totale ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
→ Si oui, l'amélioration dure combien de temps ?	<input type="text"/> <input type="text"/> semaines postcure
- L'odorat s'améliore-t-il pendant la cure ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
→ Si oui, l'amélioration est-elle totale ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
→ Si oui, l'amélioration dure combien de temps ?	<input type="text"/> <input type="text"/> semaines postcure

**Traitement injectable**

<b>Biothérapies :</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	→ Si oui, Nom de la molécule : .....
	→ Si oui, Date de début : <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>

**Observance du traitement**

<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
---

## Annexe 5

CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

### ANNEXE 1 : SNOT-22

#### Sino-Nasal Outcome Test-22 (Test d'impact des symptômes sino-nasaux-22)

Vous trouverez ci-dessous une liste de symptômes et de conséquences sociales et/ou émotionnelles liées à votre pathologie nasale. Nous aimerions en apprendre davantage sur ces problèmes et appréciations que vous répondez aux questions suivantes au meilleur de vos capacités. Il n'y a pas de bonnes ou de mauvaises réponses et vous seul(e) pouvez nous donner ces informations. Veuillez évaluer vos problèmes, tels qu'ils se sont présentés durant les deux dernières semaines. Nous vous remercions pour votre participation

En considérant la sévérité du problème quand il survient et la fréquence avec laquelle il survient, veuillez coter chaque item ci-dessous en **entourant** le chiffre qui correspond à votre ressenti, en utilisant l'échelle suivante →

	Aucun problème	Problème très léger	Problème léger	Problème modéré	Problème sévère	Problème très sévère
1. Besoin de se moucher	0	1	2	3	4	5
2. Eternuements	0	1	2	3	4	5
3. Nez qui coule	0	1	2	3	4	5
4. Toux	0	1	2	3	4	5
5. Écoulement nasal postérieur (dans la gorge)	0	1	2	3	4	5
6. Écoulement nasal épais	0	1	2	3	4	5
7. Oreilles bouchées	0	1	2	3	4	5
8. Vertiges	0	1	2	3	4	5
9. Douleur/pression dans l'oreille	0	1	2	3	4	5
10. Douleur/pression faciale	0	1	2	3	4	5
11. Difficulté pour s'endormir	0	1	2	3	4	5
12. Se réveiller la nuit	0	1	2	3	4	5
13. Manque d'une bonne nuit de sommeil (mauvaise qualité de sommeil)	0	1	2	3	4	5
14. Se réveiller fatigué	0	1	2	3	4	5
15. Fatigue (durant la journée)	0	1	2	3	4	5
16. Baisse de productivité (rendement, efficacité)	0	1	2	3	4	5
17. Baisse de concentration	0	1	2	3	4	5
18. Frustration/agitation/irritabilité	0	1	2	3	4	5
19. Baisse de moral (tristesse)	0	1	2	3	4	5
20. Gêne/inconfort	0	1	2	3	4	5
21. Perturbation du goût, de l'odorat	0	1	2	3	4	5
22. Obstruction/congestion nasale	0	1	2	3	4	5

TOTAL: \_\_\_\_\_

TOTAL GÉNÉRAL : \_\_\_\_\_

## Annexe 5

### CRF-Etude PSI (Polyps Severity Index)

Données à intégrer dans la database excel qui seront calculés à posteriori à partir des données du CRF.
IMC  _ _ _
EVA clinique intensité des symptômes ..../18
Score de Lidholt .../8
Score de Lund Mc Kay .../24
SNOT-22 (Questionnaire en Annexe) ..../110

# Annexe 6



<b>Annexe 6</b>   	<b>Note d'information pour les études HLJ</b>  Etude PSI V1.0 du 19/05/2021	Code : 20FRM0519
		Version : B
		Application: 11/06/2020 Dernière révision :
		Page 1 sur 2

Acronyme de l'étude	Etude PSI
Titre de l'étude	<b>DEVELOPPEMENT D'UN SCORE D'EVALUATION DE LA SEVERITE DANS LA POLYPOSE NASOSINUSIENNE : Score PSI</b>
Promoteur	Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil 40 avenue de Verdun, 94000 CRETEIL
Structure en charge de la protection des données	DPO Consulting, <a href="mailto:dpo@chicreteil.fr">dpo@chicreteil.fr</a>

Madame, Monsieur,

Le Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil est à l'initiative de cette recherche. Votre participation à l'étude n'a pas de conséquence sur les soins et le traitement que vous recevrez. Il est important de lire attentivement cette note avant de prendre votre décision ; n'hésitez pas à demander des explications au médecin qui vous propose de participer à l'étude.

### Objectif de la recherche

Votre médecin vous a diagnostiqué une polypose nasosinusienne. Il s'agit d'une maladie chronique inflammatoire parfois associée à l'asthme ou une intolérance à l'aspirine. Il existe plusieurs traitements dont l'objectif thérapeutique est le contrôle de la maladie et donc l'amélioration de vos symptômes. Le traitement médical de fond correspond aux irrigations nasales et glucocorticoïdes par voie locale, parfois associé à des cures courtes de glucocorticoïdes par voie orale. La chirurgie joue un rôle important car elle permet d'améliorer les symptômes et l'efficacité des traitements locaux mais certains patients nécessitent parfois une reprise chirurgicale en raison de la réapparition de polypes avec symptômes gênants. Pour adapter au mieux les traitements, une évaluation précise de la sévérité de la maladie doit être réalisée. Ainsi, un questionnaire vous est remis pour estimer l'impact sur votre qualité de vie des symptômes liés à la polypose nasosinusienne (obstruction nasale, troubles de l'odorat, écoulement nasal antérieur ou postérieur, douleurs sinusiennes). Une nasofibroscopie, un examen tomodensitométrique (TDM) ou un cone beam (CBCT) des sinus et une prise de sang doivent également être réalisés. L'ensemble de ces examens sont réalisés que vous acceptiez ou non de faire partie de l'étude car ils font partie du bilan réalisé en routine et sont nécessaires à votre prise en charge optimale.

Au bout de 3 mois de traitement médical, conformément à la prise en charge habituelle, lors de la consultation de suivi nous renouvelerons l'examen clinique et le questionnaire d'impact sur la qualité de vie, pour apprécier le contrôle de votre maladie.

Nous vous proposons de participer à une étude cherchant à identifier de façon précise les différents degrés de sévérité de la maladie pour améliorer la prise en charge des patients. L'objectif est de développer un score de sévérité de la polypose nasosinusienne à partir des données recueillies lors de votre prise en charge habituelle. Cette étude se déroulera sur 7 centres et concernera 550 patients.

### Déroulement de l'étude

Si vous ne vous opposez pas à la participation à l'étude, vos données médicales concernant votre bilan initial seront recueillies ainsi que les données obtenues lors de votre suivi après 3 mois de traitement.

Vous pourrez tout au long de l'étude demander des explications sur son déroulement au médecin qui vous suit. Votre dossier médical restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité de votre médecin. A l'issue de l'étude et après analyse des données relatives à cette étude, vous pourrez être informé(e)s des résultats globaux de l'étude, par l'intermédiaire du médecin qui vous suit.

<b>Annexe 6</b>  	<b>Note d'information pour les études HLJ</b>  Etude PSI V1.0 du 19/05/2021	Code : 20FRM0519
		Version : B
		Application: 11/06/2020 Dernière révision :
		Page 2 sur 2

### Encadrement réglementaire

Le CHIC a pris toutes les mesures pour mener cette recherche conformément aux dispositions du Code de la santé Publique applicables aux recherches n'impliquant pas la personne humaine. La recherche a obtenu l'avis favorable du comité d'éthique du CHIC le 21/05/2021.

### Données recueillies

Dans le cadre de la recherche à laquelle le CHI Créteil vous propose de participer, un traitement informatique de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière. Le responsable du traitement des données est le promoteur, dont les coordonnées figurent sur la première page de ce document. Ce traitement des données a pour fondement juridique l'article 6 du Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD) à savoir l'exécution d'une mission d'intérêt public dont est investi le responsable de traitement et les intérêts légitimes poursuivis par lui. De plus, au titre de l'article 9 du RGPD le responsable de traitement peut de manière exceptionnelle traiter des catégories particulières de données, incluant des données de santé notamment à des fins de recherche scientifique.

Les données collectées seront rendues non identifiantes et ne pourront être consultées que par les autorités de santé et par des personnes dûment mandatées par le promoteur de l'essai et soumises au secret professionnel, sous la responsabilité de votre médecin. Les données seront traitées conformément à la méthodologie de référence MR004 de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) pour laquelle le CHI Créteil a signé un engagement de conformité. Ces données seront conservées pour une durée maximale de 2 ans à l'issue de la dernière publication.

Conformément aux dispositions de la CNIL (règlement européen 2016/679 sur la protection des données), vous disposez d'un droit d'accès, de rectification, de limitation et d'opposition relative au traitement de vos données personnelles. Ces droits s'exercent auprès du délégué à la protection des données (DPO) : [dpo@chicreteil.fr](mailto:dpo@chicreteil.fr). Les données relatives à cette étude resteront au CHI Créteil, promoteur de la recherche ou pourront être communiquées aux personnes ou sociétés agissant pour son compte et qui sont situés en France ou au sein de l'union européenne.. Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises.

Vos données pourront être utilisées pour des recherches ultérieures ou des analyses complémentaires à la présente recherche, en rapport avec votre pathologie. Vous pouvez retirer à tout moment votre consentement à l'utilisation ultérieure de vos données auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de cette recherche ou auprès du DPO ([.dpo@chicreteil.fr](mailto:dpo@chicreteil.fr))

Lorsque vous aurez lu cette lettre d'information et obtenu les réponses aux questions que vous vous posez en interrogeant votre médecin, vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette étude.

Médecin coordonnateur de l'étude : Emilie Bequignon

Médecins investigateurs de l'étude : Sophie Bartier, André Coste, Clémentine Daveau, Justin Michel, Geoffrey Mortuaire, Jean François Papon, Benjamin Verillaud

## Annexe 7



1 **Title: SURGICAL MANAGEMENT IN CHRONIC RHINOSINUSITIS WITH NASAL POLYPS: A**  
2 **REVIEW**

3 **Authors:** Maxime Fieux, MD<sup>1</sup> ; Cécile Rumeau, MD, PhD<sup>2</sup> ; Guillaume De Bonnecaze, MD PhD<sup>3</sup> ; Justin  
4 Michel, MD, PhD<sup>4</sup> ; Jean-François Papon, MD, PhD<sup>5</sup> ; Geoffrey Mortuaire, MD, PhD<sup>6</sup>

5 <sup>1</sup> *Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Service d'ORL, d'otoneurochirurgie et de chirurgie*  
6 *cervico-faciale, F-69310 Pierre Bénite, France ; Université de Lyon, Université Lyon 1, F-69003, Lyon,*  
7 *France ; Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, CNRS ERL 7000, F-94010 Créteil, France*

8 <sup>2</sup> *Université de Lorraine, CHRU-Nancy, service ORL, F-54000, France ; Université de Lorraine, DevAH, F-*  
9 *54000 Nancy, France*

10 <sup>3</sup> *Service d'ORL et chirurgie cervico-faciale, Pôle clinique des voies respiratoires, Hôpital Larrey, 24, chemin de*  
11 *Pouvoirville, TSA 30030, F-31059 Toulouse, France ; Université Paul Sabatier Toulouse III ; Laboratoire*  
12 *Center for Anthropobiology and Genomics of Toulouse, F-31059 Toulouse, France*

13 <sup>4</sup> *Aix-Marseille Univ, APHM, IUSTI, CNRS, La Conception University Hospital, Department of Oto-Rhino-*  
14 *Laryngology Head and Neck Surgery, F-13005, Marseille, France*

15 <sup>5</sup> *Service d'ORL, de chirurgie cervico faciale, Hôpital Kremlin Bicêtre, Assistance Publique des Hôpitaux de*  
16 *Paris, F-94270 Paris, France ; Université Paris-Saclay, DMU Neurosciences, Le Kremlin-Bicêtre, INSERM,*  
17 *IMRB, CNRS ERL 7000, F-94010 Créteil, France*

18 <sup>6</sup> *Service d'ORL et de chirurgie cervico faciale, Hôpital Huriez, CHU Lille Rue Michel Polonovski, F-59000*  
19 *Lille, France ; Université de Lille ; Inserm U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in*  
20 *Inflammation, F-59000 Lille, France.*

21 **Corresponding author:**

22 Maxime FIEUX, MD

23 Service d'ORL, d'otoneurochirurgie et de chirurgie cervico-faciale

24 Hospices Civils Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud ; 165 Chemin du Grand Revoyet, 69310 Pierre-Bénite,  
25 France ; Tél +33 4 72 66 64 15 ; Fax +33 4 78 86 33 36

26 E-mail: [maxime.fieux@chu-lyon.fr](mailto:maxime.fieux@chu-lyon.fr); ORCID ID : 0000-0001-8317-2286

27

28 **Declarations:**

29 Ethics approval and consent to participate : not applicable

30 Consent for publication : not applicable

31 Availability of data and materials: Data supporting reported results are available on reasonable request

32 Competing interests : None of the authors have any conflict of interest in connection to this study.

33 Funding : This research received no external funding.

34 Authors' contributions : All authors contributed to conceptualization, data curation, formal analysis, and  
35 validation of the original draft. GM, CR et MF contributed to review and editing.

36 Acknowledgements: Authors wish to thank all members of the French Association of Rhinology (AFR) for  
37 their help and support and Véréna Landel (Direction de la Recherche en Santé, Hospices Civils de Lyon) for her  
38 help in manuscript preparation.

39 **Abstract**

40 **Purpose:** This up-to-date review assesses the surgical indications in the management of chronic rhinosinusitis  
41 with nasal polyps (CRSwNP).

42 **Methods:** It was conducted and reported according to the criteria stated by the Synthesis Without Meta-analysis  
43 (SwiM) recommendations. From the PUBMED-National Library of Medicine database, 1098 articles were  
44 identified between 2006 and 2021 using the key words “nasal polyps” and “surgery”.

45 **Results:** After screening and analysis, 39 publications were selected. The symptomatic recovery of CRSwNP  
46 patients after sinus surgery is established by the improvement of specific quality of life scores (SNOT-22)  
47 whereas olfactory disorders are expected to improve in 50% of patients. The 4-year surgical revision rate for  
48 disease relapse is estimated to be around 15%. Otherwise, CRSwNP symptoms can be controlled for many years  
49 after surgery, with symptomatic recurrence reported sometimes after 10 years although the medical treatment is  
50 still implemented.

51 **Conclusion:** The criteria to undergo sinus surgery in CRSwNP are not yet clearly established in the literature.  
52 However, several authors consider a well-conducted local treatment for 8 weeks or more, associated with at least  
53 one course of systemic corticosteroid, as a reliable indication. No comparative study or meta-analysis is currently  
54 available to determine the superiority of one surgical technique over another.

55

56 **Key words:** chronic rhinosinusitis; revision surgery; nasal polyp; review; quality of life

57 **Introduction**

58 The treatment of CRSwNP is primarily based on local and oral corticosteroid (OCS). However, up to  
59 50% of patients will undergo sinus surgery to alleviate persistent symptoms<sup>1-3</sup>. The efficacy of surgery is well  
60 recognized<sup>2,4-6</sup> while 20% of patients will require a revision surgery at 5 years<sup>2</sup>.

61 CRSwNP encompasses many different clinical patterns with variable response to treatment<sup>7</sup>. Precise  
62 criteria defining disease severity and control are lacking in current literature, meaning that the clinical status  
63 leading to sinus surgery and the extent of the procedure to perform for a specific patient largely depends on the  
64 expertise and/or habits of the surgeon. Several biologics are now available as an alternative to surgery in the  
65 treatment of refractory CRSwNP as they have shown conclusive results regarding quality of life improvement,  
66 OCS use reduction and delayed need for further surgery<sup>8-11</sup>. Defining the respective role of surgery and  
67 biologics is an unmet need.

68 Here, we carried out a review on recent literature regarding surgical management in CRSwNP. The  
69 main objectives were i) To assess the efficacy of sinus surgery on symptoms and quality of life in CRSwNP; ii)  
70 To identify the criteria for disease severity leading to surgery; iii) To compare the different surgical procedures  
71 (polypectomy, functional endoscopic sinus surgery and radical ethmoidectomy) in terms of patient outcomes  
72 improvement; iii) To compare the efficacy of corticosteroid and surgical treatments; and iv) To define the rate of  
73 surgical revision and the factors associated with disease relapse after a first surgical procedure.

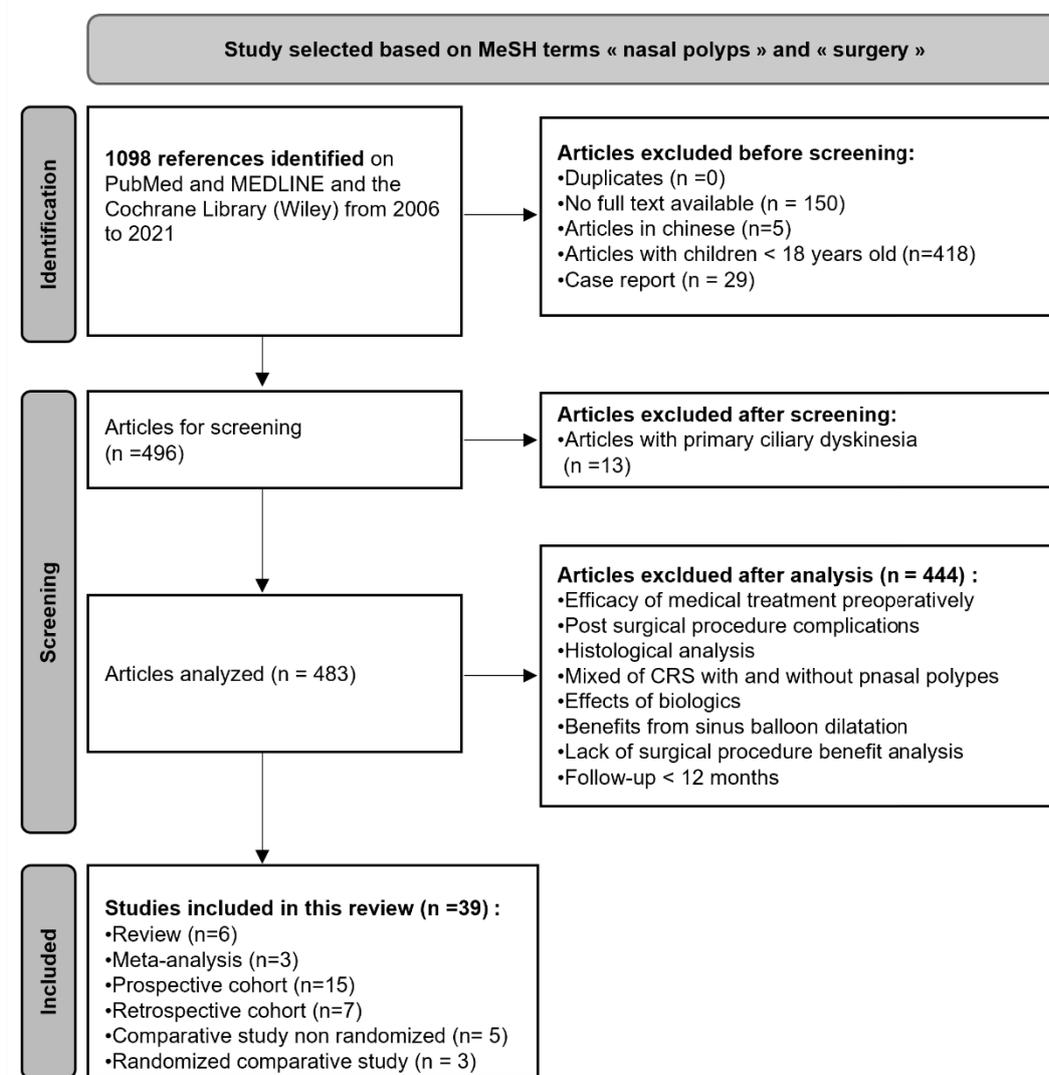
74 **Methods**

75 A literature review was carried out according to the Synthesis Without Meta-analysis (SwiM)  
76 recommendations<sup>12</sup>. Data extraction was conducted for recent references from January 2006 until March 30,  
77 2022.

78 Eligibility criteria included all peer-reviewed articles regarding surgical management in CRSwNP. We  
79 selected original publications reporting information on the type of surgical procedures and their efficacy on  
80 patient outcomes. Visual analog scale (VAS) symptom scores and quality of life questionnaire scores before and  
81 after surgery were systematically analyzed when reported by the authors. Studies were identified by searching  
82 the US National Library of Medicine databases (PubMed and MEDLINE) and the Cochrane Library (Wiley).  
83 The specific search terms and Boolean strategy were as follows ("Nasal polyps" [Mesh] AND "Surgery" [Mesh])  
84 AND (English [language] OR French [language]). The study flow chart is shown in Figure 1. Case-reports and  
85 iterative work with resubmission were excluded. For each study, we provided its level of evidence and a  
86 narrative summary of the results, structured around the type of surgical procedure, the characteristics of the  
87 population, and the type of outcomes (symptoms, quality of life questionnaires scores, Lund Kennedy  
88 endoscopic score, Lund MacKay computed tomography score). In the tables, studies are presented in  
89 chronological order.

90 **Results**91 **Clinical presentation of patients eligible for sinus surgery in CRSwNP**

92 As reported in the flow chart, 1098 articles were identified between 2006 and 2022 and after screening, 39  
 93 publications were eventually retained for analysis (Figure 1).

94 **Figure 1:** Flow chart

95  
 96 We observed a significant heterogeneity regarding the size of the population (from 47 to 34 220) and the  
 97 duration of follow-up after surgery (from 15 months to 24 years). By pooling available demographic and clinical  
 98 data of the patients derived from the combined results of 9 studies (n=3515), we reported an associated asthma  
 99 up to 67% of the patients <sup>4,13-20</sup>. The time from first procedure to revision surgery ranged from 6 months to 11  
 100 years <sup>4,13-20</sup>. The preoperative endoscopic Lund Kennedy score ranged from 8.5 to 9.8/10 <sup>4,13-20</sup>. The average  
 101 preoperative Lund McKay score was 16.3 [12.4-22/24] and the average SNOT-22 quality of life score was 47.1  
 102 [33.2-64/110] <sup>4,13-20</sup>.

103 **Outcomes of sinus surgery in CRSwNP**

104 Five studies used the change from baseline in SNOT-22 score to assess the efficacy of sinus surgery. With a total  
 105 of 4430 patients operated on, regardless the extent of the surgical procedure and a mean follow-up time of 28  
 106 months ( $\pm 18$ ), the postoperative SNOT-22 score was systematically improved (Table 1) <sup>2,4-6,13</sup>. A meta-analysis  
 107 conducted by Zhao *et al.* in 2021 evaluating the evolution of olfactory function after endoscopic surgery for  
 108 nasal polyposis pooled data from 4 studies (202 patients) using the Sniffin'sticks test and data from 10 studies  
 109 (564 patients) using VAS <sup>3</sup>. The authors reported a significant improvement of olfactory disorders after sinus  
 110 surgery. On the contrary, a review build-up on 24 studies and 959 patients described an initial improvement in  
 111 olfaction in 50% of cases with a further deterioration up to 10% of patients at 6 months <sup>21,22</sup>. In this study, the  
 112 authors could not conclude on the efficacy of the sinus surgery on olfactory impairment <sup>3</sup>.

113

114 **Table 1: SNOT-22 score evolution after sinus surgery for CRSwNP**

	Study design	Level of evidence	Number of patients	Follow-up (months)	Mean SNOT-22 change from baseline
Hopkins C, <i>et al.</i> 2006 [17]	Cohort	2	2176	36	+15.0
Hopkins C, <i>et al.</i> 2009 [4]	Cohort	2	1952	60	+14.0
Rudmik L, <i>et al.</i> 2015 [8]	Cohort	2	126	14	+8.9 *
Le PT, <i>et al.</i> 2018 [7]	Meta-analysis	1	3048	17	+23.0
Beswick DM, <i>et al.</i> 2018 [6]	Cohort	2	176	15	+29.0

115 \*A change from baseline of more than 8.9 (considered as the Minimal Clinically Important Difference for SNOT  
 116 22) was observed in 80 % of patients

117 Abbreviations: SNOT= sinonasal outcome test

118

119

120 **Indications for sinus surgery in CRSwNP**

121 Concerning the criteria leading to sinus surgery, 5 studies with a total of 959 patients offered some clues  
 122 <sup>4,6,17,18,23</sup>. The main criterion for sinus surgery was a failure to improve symptoms despite the administration of a  
 123 so-called maximal medical treatment. Few studies described their definition of a maximal medical treatment  
 124 (Table 2). A review of the literature published in 2015 sought to define the maximal medical treatment applied  
 125 before surgery in CRSwNP <sup>24</sup>. Eighty-two studies were selected (11 randomized trials, 57 cohorts, 13  
 126 retrospective studies and 1 consensus statement), CRSwNP patients were included exclusively in 19 studies,  
 127 CRS patients without polyps (CRSsNP) in 3 studies and CRSwNP or CRSsNP patients in 60 studies. Before  
 128 surgery, intranasal corticosteroids (INCS) were used in 91% of the studies (for 8 weeks (+/- 8 weeks)), OCSs in  
 129 61.7% (74% in the studies strictly including patients with CRSwNP) (for 18 days +/- 12 days), oral antibiotics in  
 130 87.7% of the studies (for 23 days +/- 8 days). Only 26 studies specified the criteria for “failed” maximal medical  
 131 treatment leading to surgery <sup>24</sup>. The typical profile for sinus surgery was a patient with a concomitant asthma, a  
 132 past history of sinus surgery, an endoscopic Lund Kennedy score between 8.5 and 9.8/10, a mean Lund Mackay  
 133 CT score and a mean SNOT-22 quality of life score estimated to respectively 16.3/24 and 47.1/110 <sup>4,13-20</sup>.

134

135 **Table 2: Eligibility criteria leading to sinus surgery in CRSwNP**

	Study Design	Level of evidence	Number of patients	Eligibility Criteria
Bassiouni A, <i>et al.</i> 2013 [21]	Cohort	4	299	Persistent symptoms despite the use of : INCS (2M) + OCS (3W) + saline irrigation
Rudmik L, <i>et al.</i> 2015 [8]	Cohort	2	126	Persistent symptoms despite the use of : INCS (3M) + OCS (7D) + ATB <i>per os</i> (15D)
DeConde AS, <i>et al.</i> 2015 [25]	Prospective and comparative study	3	311	Persistent symptoms despite the use of : INCS + OCS + ATB (no details regarding dose and duration)
Chen FH, <i>et al.</i> 2016 [22]	Cohort	4	47	Persistent symptoms with a Lund Kennedy endoscopic score > 2 despite the use of medical treatment: No details regarding the type of medical treatment (3M)
Beswick DM, <i>et al.</i> 2018 [6]	Cohort	2	176	Persistent symptoms despite the use of : INCS (> 8W) + OCS (1 to 3W)

136 Abbreviations: ATB = antibiotics, INCS = intranasal corticosteroid, OCS = oral corticosteroid, D = day, M  
 137 =month, W = week

**138 Comparison of surgical procedures in CRSwNP**

139 Ten studies <sup>4,13,15-18,20,23,25,26</sup> compiling the data from 3385 patients were retained for the comparison of  
140 the surgical procedures (Table 3). A literature review published in 2014 analyzing the results of 1,896 articles  
141 found 6 studies<sup>27-32</sup> with only a poor validity to allow a comparative analysis between the different surgical  
142 procedures classically described (polypectomy, partial ethmoid sinus opening also considered as functional  
143 endoscopic sinus surgery (FESS) and complete ethmoid sinus opening with or without frontal sinus drilling)<sup>33</sup>.  
144 As described above, another pitfall was related to the variability of patient profiles before surgery (comorbid  
145 asthma, revision surgery) and the variability of postoperative medical treatment protocol (intranasal  
146 corticosteroid, OCS, antibiotics, saline nasal irrigation (alone or combined with different pharmacologic agents),  
147 with different doses and durations). However, several studies recommend the use of a radical surgical procedure  
148 with complete ethmoidectomy <sup>17,18,23,27,34,35</sup>, sometimes associated with a Draf-3 frontal sinus procedure <sup>15</sup> or a  
149 middle turbinectomy <sup>16</sup>. Here again, the one-year postoperative quality of life score (SNOT-22) improvement is  
150 demonstrative but the symptomatic benefit seems to decrease after 3 and 5 years <sup>15</sup>, so as the assumption of long  
151 term benefit must be addressed with caution.

152 Other authors found neither a superiority of FESS versus polypectomy (based on post-treatment SNOT-  
153 22 scores or proportion of patients achieving a minimal clinically important difference at 3 months)<sup>25</sup> nor a  
154 superiority of radical ethmoidectomy versus a more limited sinus opening even though at one year extensive  
155 endoscopic sinus surgery may help to improve the subjective olfaction and endoscopic appearance <sup>18</sup>. Indeed,  
156 Chen *et al.* reported mixed results when comparing 23 patients operated on by radical surgery and 24 patients  
157 operated on by FESS: some clinical parameters were not different at 1 year between the 2 groups (VAS  
158 symptoms score for obstruction or rhinorrhea, asthma control score, and lung function), but others were better  
159 improved in the radical surgery group (VAS olfactory score and postoperative Lund-Kennedy endoscopic score)  
160 <sup>18</sup>. A prospective randomized study comparing polypectomy to sinus surgery with adapted opening of the ostia  
161 according to the mucosal involvement is underway <sup>26</sup>.

162 **Table 3 : Surgical procedures for CRSwNP**

	<b>Number of patients</b>	<b>Surgical procedures</b>
Hopkins C, <i>et al.</i> 2006 [17]	2176	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polypectomy (993 pts)</li> <li>• Anterior ethmoidectomy +/- posterior +/- meatotomy (528 pts)</li> <li>• Other functional endoscopic sinus surgeries (655 pts)</li> </ul>
Bassiouni A, <i>et al.</i> 2013 [21]	299	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Total ethmoidectomy + sphenoidotomy + Draf 2b</li> <li>• Total ethmoidectomy + Draf 3 if prior history of ethmoidectomy +/- Caldwell luc</li> </ul>
DeConde AS, <i>et al.</i> 2015 [25]	120	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bilateral ethmoidectomy + meatotomy + sphenoidotomy + frontal sinusotomy (147pts)</li> <li>• Targeted endoscopic sinus surgery (164 pts)</li> </ul>
Chen FH, <i>et al.</i> 2016 [22]	47	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bilateral radical ethmoidectomy + middle turbinectomy (23 pts)</li> <li>• Functionnal surgery (= Messerklinger procedure) (24 pts)</li> </ul>
Beswick DM, <i>et al.</i> 2018 [6]	176	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uni- or bilateral meatotomy + partial or total ethmoidectomy + sphenoidotomy or frontal sinusotomy</li> </ul>
Kilty SJ, <i>et al.</i> 2018 [27]	48	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polypectomy (24 pts)</li> <li>• Partial ethmoidectomy (24 pts)</li> </ul>
Zhang L, <i>et al.</i> 2020 [19]	81	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ethmoidectomy + bilateral meatotomy + sphenoidotomy and frontal sinusotomy + draf 3 (27 pts)</li> <li>• Radical ethmoidectomy (27 pts)</li> <li>• Ethmoidectomy + bilateral meatotomy + sphenoidotomy and frontal sinusotomy without middle turbinate resection (27 pts)</li> </ul>
Delarestaghi MM, <i>et al.</i> 2020 [20]	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Total ethmoidectomy + bilateral meatotomy + sphenoidotomy + frontal sinusotomy with or without middle turbinectomy</li> </ul>
Kilty S, <i>et al.</i> 2020 [28]	126	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polypectomy without ostia opening under local anesthesia</li> <li>• Polypectomy + ethmoidectomy + adapted opening of the ostia under general anesthesia</li> </ul>
Li W, <i>et al.</i> 2021 [29]	222	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ethmoidectomy + Draf 2a ou Draf 3</li> </ul>

**164 Comparison of medical treatment and surgery in CRSwNP**

165 A Cochrane review gathered the results of 4 randomized studies comparing the efficacy of medical  
166 treatment (OCS therapy +/- combined with antibiotics) versus surgical treatment (polypectomy or functional  
167 surgery +/- combined with local corticoids) for a total of 231 patients <sup>36-39</sup>. The authors showed no superiority of  
168 surgical treatment over medical treatment at 12 months on quality of life as measured by the SNOT-22  
169 questionnaire. No meta-analysis was feasible due to patient selection bias <sup>40</sup>. Another review did not find a clear  
170 argument for preferring a therapeutic approach or for defining the timing of surgery regardless of the extent of  
171 mucosal resection <sup>41</sup>. Leung *et al.* used *Medicare* medical data to compare OCS and surgery based on the  
172 benefit/risk balance. They asserted that surgery should be favored beyond 1 course per year of OCS when  
173 asthma is associated and beyond 2 courses per year when nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated  
174 respiratory disease (N-ERD) is reported (1 course of OCS was defined as 30 mg per day of prednisone for 2  
175 weeks) <sup>42</sup>.

176

**177 Factors associated with surgery efficacy in CRSwNP**

178 The predictive criteria for surgical benefit on clinical symptoms are variable among the studies dealing  
179 with this subject: higher preoperative SNOT 22 score <sup>5,6,43</sup>; high preoperative Lund Mackay score <sup>14</sup>; radical  
180 ethmoidectomy <sup>15</sup>; combination of radical ethmoidectomy with middle turbinectomy <sup>16</sup>; CRSwNP without  
181 comorbid asthma and first surgical procedure <sup>20</sup>.

182

**183 Factors associated with revision surgery in CRSwNP**

184 Six studies reported the rate of revision surgery in patients with CRSwNP<sup>34,35,44-47</sup>. With a total of 35  
185 868 patients followed during 11 years ( $\pm 7.8$ ), the rate of surgical revision was estimated between 12.8% and  
186 62% (Table 4). Risk factors for disease recurrence leading to revision surgery were: high preoperative Lund  
187 Mackay score before the first surgery <sup>34,48</sup>, presence of N-ERD <sup>34,35,45,49</sup>, comorbid asthma <sup>45-47,49</sup>, non radical  
188 ethmoidectomy <sup>2,34,45,50</sup>, past history of sinus surgery <sup>35,45</sup>, time to prior revision surgery inferior to 3 years <sup>35</sup>, and  
189 biological markers of T2 inflammation in blood and in nasal polyps samples <sup>48,49,51-56</sup> <sup>54-56</sup>.

190 **Table 4: Revision surgery rate for persistent symptoms in CRSwNP**

	Study design	Level of evidence	Number of patients	Follow-up (years)	Revision surgery rate (+/- time to recurrence)
Wu AW, <i>et al.</i> 2014 [47]	Cohort	2	299	3 to 24	13% (4.8 years)
Loftus CA, <i>et al.</i> 2019 [48]	Meta-analysis	1	34220	5	16%
Sella GCP, <i>et al.</i> 2020 [49]	Cohort	2	120	11	25%
Vlaminck S, <i>et al.</i> 2020 [50]	Cohort	4	133	10	62%
Lilja M, <i>et al.</i> 2021 [37]	Cohort	4	116	9.9	38% (4 years)
Hopkins C, <i>et al.</i> 2021 [38]	Cohort	2	980	5	15%

191  
192193 **Conclusions**

194 The short-term efficacy (12 to 36 months) of surgery on the improvement of patients' quality of life  
 195 measured by the SNOT-22 score is established, although available data are insufficient to conclude on the  
 196 superiority of one surgical procedure over another. Beyond one year of follow-up, radical ethmoidectomy seems  
 197 to be more effective to control the symptoms. A non-radical approach as a first procedure is considered a risk-  
 198 factor for disease recurrence requiring revision surgery.

199 **References**

- 200 1. Passali D, Passali GC, Piemonte M, et al. The management of chronic rhinosinusitis in clinical practice:  
201 An International Survey. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2021;35(1 Suppl. 2):45-50. doi:10.23812/21-  
202 1supp2-9
- 203 2. Hopkins C, Slack R, Lund V, Brown P, Copley L, Browne J. Long-term outcomes from the English  
204 national comparative audit of surgery for nasal polyposis and chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*.  
205 2009;119(12):2459-2465. doi:10.1002/lary.20653
- 206 3. Zhao R, Chen K, Tang Y. Olfactory changes after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis: A  
207 meta-analysis. *Clin Otolaryngol*. 2021;46(1):41-51. doi:10.1111/coa.13639
- 208 4. Beswick DM, Mace JC, Soler ZM, et al. Appropriateness criteria predict outcomes for sinus surgery and  
209 may aid in future patient selection. *The Laryngoscope*. 2018;128(11):2448-2454. doi:10.1002/lary.27227
- 210 5. Le PT, Soler ZM, Jones R, Mattos JL, Nguyen SA, Schlosser RJ. Systematic Review and Meta-analysis of  
211 SNOT-22 Outcomes after Surgery for Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyposis. *Otolaryngol--Head  
212 Neck Surg*. 2018;159(3):414-423. doi:10.1177/0194599818773065
- 213 6. Rudmik L, Soler ZM, Mace JC, DeConde AS, Schlosser RJ, Smith TL. Using preoperative SNOT-22  
214 score to inform patient decision for Endoscopic sinus surgery. *The Laryngoscope*. 2015;125(7):1517-1522.  
215 doi:10.1002/lary.25108
- 216 7. Nakayama T, Lee IT, Le W, et al. Inflammatory molecular endotypes of nasal polyps derived from White  
217 and Japanese populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(4):1296-1308.e6.  
218 doi:10.1016/j.jaci.2021.11.017
- 219 8. Han JK, Bachert C, Fokkens W, et al. Mepolizumab for chronic rhinosinusitis with nasal polyps  
220 (SYNAPSE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. Published  
221 online April 16, 2021. doi:10.1016/S2213-2600(21)00097-7
- 222 9. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, et al. Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic  
223 rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from  
224 two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet Lond  
225 Engl*. 2019;394(10209):1638-1650. doi:10.1016/S0140-6736(19)31881-1
- 226 10. Gevaert P, Omachi TA, Corren J, et al. Efficacy and safety of omalizumab in nasal polyposis: 2  
227 randomized phase 3 trials. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(3):595-605. doi:10.1016/j.jaci.2020.05.032
- 228 11. Bachert C, Han JK, Desrosiers MY, et al. Efficacy and safety of benralizumab in chronic rhinosinusitis  
229 with nasal polyps: A randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(4):1309-  
230 1317.e12. doi:10.1016/j.jaci.2021.08.030
- 231 12. Campbell M, McKenzie JE, Sowden A, et al. Synthesis without meta-analysis (SWiM) in systematic  
232 reviews: reporting guideline. *BMJ*. 2020;368:l6890. doi:10.1136/bmj.l6890
- 233 13. Hopkins C, Browne JP, Slack R, et al. Complications of surgery for nasal polyposis and chronic  
234 rhinosinusitis: the results of a national audit in England and Wales. *The Laryngoscope*. 2006;116(8):1494-  
235 1499. doi:10.1097/01.mlg.0000230399.24306.50
- 236 14. Brooks SG, Trope M, Blasetti M, et al. Preoperative Lund-Mackay computed tomography score is  
237 associated with preoperative symptom severity and predicts quality-of-life outcome trajectories after sinus  
238 surgery. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2018;8(6):668-675. doi:10.1002/alr.22109
- 239 15. Zhang L, Zhang Y, Gao Y, et al. Long-term outcomes of different endoscopic sinus surgery in recurrent  
240 chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma. *Rhinology*. 2020;58(2):126-135.  
241 doi:10.4193/Rhin19.184

- 242 16. Delarestaghi MM, Rajaeih S, Firouzabadi FD, et al. Evaluation of the effect of endoscopic partial  
243 middle turbinectomy surgery on the quality of life of patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps.  
244 *Rhinology*. 2020;58(3):208-212. doi:10.4193/Rhin19.258
- 245 17. Bassiouni A, Wormald PJ. Role of frontal sinus surgery in nasal polyp recurrence. *The Laryngoscope*.  
246 2013;123(1):36-41. doi:10.1002/lary.23610
- 247 18. Chen FH, Deng J, Hong HY, et al. Extensive versus functional endoscopic sinus surgery for chronic  
248 rhinosinusitis with nasal polyps and asthma: A 1-year study. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(2):143-148.  
249 doi:10.2500/ajra.2016.30.4271
- 250 19. Lee JY, Lee SW, Lee JD. Comparison of the surgical outcome between primary and revision endoscopic  
251 sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Am J Otolaryngol*. 2008;29(6):379-384.  
252 doi:10.1016/j.amjoto.2007.11.005
- 253 20. Li W, Ho J, Grayson JW, et al. Evaluation of Diffuse Type 2 Dominant or Eosinophilic Chronic  
254 Rhinosinusitis With Corticosteroid Irrigation After Surgical Neosinus Cavity Formation. *JAMA*  
255 *Otolaryngol-- Head Neck Surg*. 2021;147(4):360-367. doi:10.1001/jamaoto.2020.5286
- 256 21. Haxel BR. Recovery of olfaction after sinus surgery for chronic rhinosinusitis: A review. *The*  
257 *Laryngoscope*. 2019;129(5):1053-1059. doi:10.1002/lary.27764
- 258 22. Haxel BR, Boessert P, Weyer-Elberich V, Fruth K. Course of olfaction after sinus surgery for chronic  
259 rhinosinusitis. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2017;2(5):269-275. doi:10.1002/lio2.109
- 260 23. DeConde AS, Suh JD, Mace JC, Alt JA, Smith TL. Outcomes of complete vs targeted approaches to  
261 endoscopic sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5(8):691-700. doi:10.1002/alr.21541
- 262 24. Dautremont JF, Rudmik L. When are we operating for chronic rhinosinusitis? A systematic review of  
263 maximal medical therapy protocols prior to endoscopic sinus surgery. *Int Forum Allergy Rhinol*.  
264 2015;5(12):1095-1103. doi:10.1002/alr.21601
- 265 25. Kilty SJ, Lasso A, Mfuna-Endam L, Desrosiers MY. Case-control study of endoscopic polypectomy in  
266 clinic (EPIC) versus endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with polyps. *Rhinology*.  
267 2018;56(2):155-157. doi:10.4193/Rhin17.115
- 268 26. Kilty S, Thavorn K, Janjua A, et al. Endoscopic polypectomy performed in clinic for chronic rhinosinusitis  
269 with nasal polyps: study protocol for the EPIC multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open*.  
270 2020;10(12):e042413. doi:10.1136/bmjopen-2020-042413
- 271 27. Jankowski R, Pigret D, Decroocq F, Blum A, Gillet P. Comparison of radical (nasalisation) and functional  
272 ethmoidectomy in patients with severe sinonasal polyposis. A retrospective study. *Rev Laryngol - Otol -*  
273 *Rhinol*. 2006;127(3):131-140.
- 274 28. Kuehnemund M, Lopatin A, Amedee RG, Mann WJ. Endonasal sinus surgery: extended versus limited  
275 approach. *Am J Rhinol*. 2002;16(4):187-192.
- 276 29. Sauer M, Lemmens W, Vauterin T, Jorissen M. Comparing the microdebrider and standard instruments in  
277 endoscopic sinus surgery: a double-blind randomised study. *B-ENT*. 2007;3(1):1-7.
- 278 30. Selivanova O, Kuehnemund M, Mann WJ, Amedee RG. Comparison of conventional instruments and  
279 mechanical debridors for surgery of patients with chronic sinusitis. *Am J Rhinol*. 2003;17(4):197-202.
- 280 31. Venkatachalam VP, Jain A. Comparative evaluation of functional endoscopic sinus surgery and  
281 conventional surgery in the management of chronic sinusitis. *J Indian Med Assoc*. 2002;100(2):78-79, 82-  
282 83.
- 283 32. Wadwongtham W, Aeumjaturapat S. Large middle meatal antrostomy vs undisturbed maxillary ostium in  
284 the endoscopic sinus surgery of nasal polyposis. *J Med Assoc Thai Chotmai Thangphaet*. 2003;86  
285 Suppl 2:S373-378.

- 286 33. Sharma R, Lakhani R, Rimmer J, Hopkins C. Surgical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal  
287 polyps. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(11):CD006990. doi:10.1002/14651858.CD006990.pub2
- 288 34. Lilja MJ, Koskinen A, Virkkula P, et al. Factors Affecting the Control of Chronic Rhinosinusitis With  
289 Nasal Polyps: A Comparison in Patients With or Without NERD. *Allergy Rhinol Provid RI*.  
290 2021;12:21526567211003844. doi:10.1177/21526567211003844
- 291 35. Hopkins C, Lund V. Does time from previous surgery predict subsequent treatment failure in Chronic  
292 Rhinosinusitis with Nasal Polyps? *Rhinology*. Published online April 18, 2021. doi:10.4193/Rhin21.017
- 293 36. Alobid I, Benítez P, Bernal-Sprekelsen M, et al. Nasal polyposis and its impact on quality of life:  
294 comparison between the effects of medical and surgical treatments. *Allergy*. 2005;60(4):452-458.  
295 doi:10.1111/j.1398-9995.2005.00725.x
- 296 37. Ragab SM, Lund VJ, Scadding G. Evaluation of the medical and surgical treatment of chronic  
297 rhinosinusitis: a prospective, randomised, controlled trial. *The Laryngoscope*. 2004;114(5):923-930.  
298 doi:10.1097/00005537-200405000-00027
- 299 38. Lildholdt T, Fogstrup J, Gammelgaard N, Kortholm B, Ulsoe C. Surgical versus medical treatment of  
300 nasal polyps. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1988;105(1-2):140-143. doi:10.3109/00016488809119457
- 301 39. Lildholdt T, Runderantz H, Bende M, Larsen K. Glucocorticoid treatment for nasal polyps. The use of  
302 topical budesonide powder, intramuscular betamethasone, and surgical treatment. *Arch Otolaryngol Head  
303 Neck Surg*. 1997;123(6):595-600. doi:10.1001/archotol.1997.01900060037006
- 304 40. Rimmer J, Fokkens W, Chong LY, Hopkins C. Surgical versus medical interventions for chronic  
305 rhinosinusitis with nasal polyps. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(12):CD006991.  
306 doi:10.1002/14651858.CD006991.pub2
- 307 41. Dessouky O, Hopkins C. Surgical versus medical interventions in CRS and nasal polyps: comparative  
308 evidence between medical and surgical efficacy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15(11):66.  
309 doi:10.1007/s11882-015-0566-5
- 310 42. Leung RM, Dinnie K, Smith TL. When do the risks of repeated courses of corticosteroids exceed the risks  
311 of surgery? *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014;4(11):871-876. doi:10.1002/alr.21377
- 312 43. Saratziotis A, Emanuelli E, Zanotti C, et al. Endoscopic sinus surgery outcomes in CRS: quality of life and  
313 correlations with NOSE scale in a prospective cohort study. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck  
314 Surg*. 2021;278(4):1059-1066. doi:10.1007/s00405-020-06334-8
- 315 44. Wu AW, Ting JY, Platt MP, Tierney HT, Metson R. Factors affecting time to revision sinus surgery for  
316 nasal polyps: a 25-year experience. *The Laryngoscope*. 2014;124(1):29-33. doi:10.1002/lary.24213
- 317 45. Loftus CA, Soler ZM, Koochakzadeh S, et al. Revision surgery rates in chronic rhinosinusitis with nasal  
318 polyps: meta-analysis of risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020;10(2):199-207.  
319 doi:10.1002/alr.22487
- 320 46. Sella GCP, Tamashiro E, Sella JA, et al. Asthma Is the Dominant Factor for Recurrence in Chronic  
321 Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(1):302-309. doi:10.1016/j.jaip.2019.08.007
- 322 47. Vlaminck S, Acke F, Prokopakis E, et al. Surgery in Nasal Polyp Patients: Outcome After a Minimum  
323 Observation of 10 Years. *Am J Rhinol Allergy*. Published online October 5, 2020:1945892420961964.  
324 doi:10.1177/1945892420961964
- 325 48. Meng Y, Zhang L, Lou H, Wang C. Predictive value of computed tomography in the recurrence of chronic  
326 rhinosinusitis with nasal polyps. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(11):1236-1243. doi:10.1002/alr.22355
- 327 49. Rosati D, Rosato C, Pagliuca G, et al. Predictive markers of long-term recurrence in chronic rhinosinusitis  
328 with nasal polyps. *Am J Otolaryngol*. 2020;41(1):102286. doi:10.1016/j.amjoto.2019.102286

- 329 50. Masterson L, Tanweer F, Bueser T, Leong P. Extensive endoscopic sinus surgery: does this reduce the  
330 revision rate for nasal polyposis? *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* 2010;267(10):1557-  
331 1561. doi:10.1007/s00405-010-1233-z
- 332 51. Lu PC, Lee TJ, Huang CC, Chang PH, Chen YW, Fu CH. Serum eosinophil cationic protein: a prognostic  
333 factor for early postoperative recurrence of nasal polyps. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2021;11(4):766-772.  
334 doi:10.1002/alr.22664
- 335 52. Tosun F, Arslan HH, Karslioglu Y, Deveci MS, Durmaz A. Relationship between postoperative recurrence  
336 rate and eosinophil density of nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2010;119(7):455-459.  
337 doi:10.1177/000348941011900705
- 338 53. Ryu G, Kim DK, Dhong HJ, et al. Immunological Characteristics in Refractory Chronic Rhinosinusitis  
339 with Nasal Polyps Undergoing Revision Surgeries. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2019;11(5):664-676.  
340 doi:10.4168/aair.2019.11.5.664
- 341 54. Calus L, Van Bruaene N, Bosteels C, et al. Twelve-year follow-up study after endoscopic sinus surgery in  
342 patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Clin Transl Allergy.* 2019;9:30.  
343 doi:10.1186/s13601-019-0269-4
- 344 55. Mortuaire G, Gengler I, Carpentier C, Szymanski C, Chenivesse C, Lefevre G. T helper 2 inflammatory  
345 markers are associated with recurrence in chronic rhinosinusitis with nasal polyps after endoscopic sinus  
346 surgery. *Rhinology.* 2020;58(5):444-450. doi:10.4193/Rhin19.439
- 347 56. Grgić MV, Čupić H, Kalogjera L, Baudoin T. Surgical treatment for nasal polyposis: predictors of  
348 outcome. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* 2015;272(12):3735-3743.  
349 doi:10.1007/s00405-015-3519-7



# Annexe 8



### Protocole de mise en culture des 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 incubé (4°C, sur la nuit) dans une solution de PBS-PSGF, pronase 0.1%
- Récupérer les CENH par filtration des déchets per opératoires digérés puis centrifuger (7min, 800g)
- Reprendre le culot cellulaire dans une solution de trypsine-EDTA 0,25 % (3 min, 37°C)
- Centrifuger (7min, 800g) puis reprendre le culot cellulaire dans une solution de DMEM/F12-PSGF, sérum de veau foetal (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 constituants de la membrane basale, permettant l'adhérence sélective des CENH.

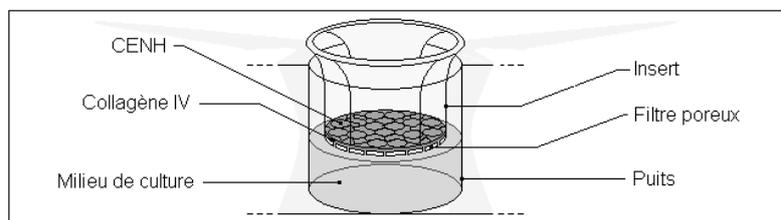


Figure 1 : Système de culture en interface air/liquide (IAL)

- Suite du protocole de mise en culture :
- **Ensemencement** : Compter les cellules et ensemercer les CENH dans l'insert à raison de 1x10<sup>6</sup> cellules/insert (1cm<sup>2</sup>)
    - 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 (CO<sub>2</sub> 5%, 37°C) pendant 24h
    - Changer le milieu DMEM/F12-PSGF, UG 2% quotidiennement jusqu'à la mise en interface air-liquide (IAL).
    - **Mise en IAL** : Au bout de 48 à 72h, 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 1ml de PBS-PSGF
    - Changer le milieu de culture tous les 2 jours avec du Pneumacult-ALI (Stemcell) + PSGF dès le passage en IAL (c'est-à-dire que la confluence du tapis cellulaire a été obtenue). La qualité des cultures est contrôlée par observations morphologiques au microscope et par la mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (RETE) avant toute expérimentation.



## Annexe 9



## Annexe 9

### Protocole de mesure de la résistance électrique transépithéliale

#### Matériel :

- Milieu pour l'expérience : Milieu de Transport
- Pôle apical : 750µL
- Pôle basal : 1ml
- Pédale + électrode + EVOM meter
- Sortir plaque de 12 puits neuve + 1 puits coaté pour faire le BLANK (NEUTRE)

#### Etape 1 : En dehors de la hotte

Nettoyer l'électrode à l'alcool puis rincer à l'eau stérile puis sécher délicatement

*Alternative issu de Wise\_2014 : The EVOM2 probe was cleaned in 70% ethanol for 15 minutes, air dried for 15 minutes, and equilibrated in ALI media for 10 minutes prior to use.*

Tout brancher : clé USB, pédale, électrode à l'EVOM meter.

#### Etape 2 : sous la hotte

- Toujours faire un *USB Test* sur la machine en arrivant pour s'assurer que les données seront bien sauvegardées automatiquement.
  - Cliquer sur SETUP > STORE Screen > new plate > name : marquer Id patient et numéro de plaque
  - Cliquer sur SETUP > Blank Reading > décocher Blank
- Faire le zéro avec un puits neutre = 1 puits vide coaté
- Déposer 750µL au pôle apical et 1ml au pôle basal de milieu de transport
  - Plonger l'électrode délicatement dans le puits
  - Cliquer sur READING > BLANK ENABLE > Retour menu

#### Etape 3 : sous hotte faire l'EVOM de la plaque

- Aspiration du PC
  - Dépôt du Milieu de transport au pôle apical (750µL) et pôle basal (1ml)
  - Mesure pour chaque puits en appuyant sur la pédale de A1 vers A2, puis B1 > B2 > B3 etc... -
- Cliquer sur STORE à la fin

Faire New plate > change name : à chaque changement de plaque

Bien attendre après avoir fait STORE à la fin avant d'enlever la clé USB



# Annexe 10



## Annexe 10

### Protocole de l'étude des jonctions serrées en immunofluorescence

#### Matériel pour marquage immunohistochimie (Ac IR et IIR) et histochimie (marquage Actine et DAPI)

- Microscope optique inversé et confocal
- Ac I<sup>R</sup> : selon expérience (ZO-1)
- Ac II<sup>R</sup> : Alexa-488
- Marquage Actine : Rhodamine phalloïdine reagent
- Mounting solution : Prolong couplé à du DAPI
- PROTÉGER DE LA LUMIÈRE une fois sorti du congélateur

#### Matériel général

- Pipette / Falcon 50ml\*2 / Dakopen
- Bistouri/ Marqueur /Vortex/ pincette de de Bakey
- Milieu de transport/ PBS<sup>+/+</sup> / Sérum Bovin (BSA)/ Normal Goat Serum (NGS)
- Agitateur magnétique
- Papier aluminium pour couvrir tout ce qui doit être protégé de la lumière

#### Préparation des solutions de dilution

- Triton 0.3% (Triton<sup>TM</sup> X-100)
- Solution de PBS <sup>+/+</sup> BSA / Normal Goat Serum (NGS) à 1%
- Solution de Phalloïdine :dilution au 1/2000<sup>e</sup> à partir de la solution pure à 1000X de Rhoda phallo
- Solution d'Ac I<sup>R</sup> de ZO-1 : Dilution au 1/1000<sup>e</sup> à partir de la solution de ZO-1 à 25mg/ml
- Solution d'Ac II<sup>R</sup> de AF-488 : Dilution au 1/100<sup>e</sup> à partir d'aliquots de 30µL à 1mg/ml
- Prolong: pour conserver la fluorescence

Note : toujours faire un puits sans Ac I<sup>R</sup>, avec juste de l'Ac II<sup>R</sup>

#### Séquence

- 1) Culture préalablement fixée dans du PFA
- 2) Perméabiliser au Triton 0.3%-8min-Room temperature (RT°) : 1ml pôle apical et pôle basal
- 3) Annoter les lames en verre selon conditions testées
- 4) Rincer PBS <sup>+/+</sup>x3
- 5) Incuber dans du BSA-PBS-NGS 1%-500µL apical et basal pendant 30min-RT°
- 6) Incuber avec la phalloïdine 300µL/puits pôle apical-1h-RT°
- 7) Laver une fois au PBS<sup>+/+</sup>
- 8) Incuber avec Ac IR : 300µL/puits pôle apical-1h-RT (O/N à 4°C alternative)
- 9) Laver 3 fois au PBS<sup>+/+</sup>
- 10) Incuber avec Ac IIR (Rabbit Alexa 488) : 300µL/puits au pôle apical-1h-RT°
- 11) Laver 4 fois au PBS<sup>+/+</sup>
- 12) Découper insert et déposer sur lame annoté
- 13) Montage : 1 goutte de Prolong puis lamelle puis laisser toute la nuit à 4°C.
- 14) Stockage possible à +4°C pendant 15J puis révéler au microscope sinon perte de fluorescence
- 15) Sortir du frigo 1h avant la révélation en microscopie confocale



# Annexe 11



## Annexe 11

### Protocole de l'étude des cils avec des microbilles sur culture primaire de CENH

#### Matériel :

- Microbilles prédiluées selon le protocole en vigueur.
- Eppendorfs de 1.5ml : 2 eppendorfs par condition
- PBS <sup>+/+</sup>
- Lames ronde épaisseur FINE ++ et lamelles
- Régler le microscope : binocular 50%, objectif x40, vitesse 357, ROI : 256\*192

#### Séquence de préparation :

- Préparer les lames (compter 2 lames par conditions pour avoir une marge) avec un cercle de graisse le moins épais possible à l'aide d'une seringue de 2,5ml et de cônes de 200µL.
- Etiquetter eppendorfs
- Préparation de la suspension de cellules : 300µL de PBS <sup>+/+</sup> puis grattage du fond de l'insert. Aspirer le contenu du puits en faisant plusieurs allez et retour pour bien récupérer toutes les cellules et les déposer dans l'eppendorf préalablement étiqueté
- Prendre 70µL de cette suspension bien au fond et le déposer dans un 2<sup>ème</sup> eppendorf de 1.5ml
- Ajouter 30µL de microbilles de polystyrène de 4,5µ
- Déposer 70µL de cette solution sur la lame préalablement préparée et couvrir.

#### Microscope

- Poser la lame à l'envers
- Recherche une bordure ciliée stable avec > 3 microbilles en mouvement.
- Déclencher enregistrement vidéos
- Faire 3 films pour chaque bordure et 3 bordures par condition, soit 9 films pour 1 puit.

Note : si possible, choisir une bordure rectiligne

Note 2 : ne pas hésiter à faire 4 ou 5 films au lieu de 3 si doute sur les mouvements des billes, l'ensemble des films de la même bordure seront interprétés en même temps, donc cela ne modifiera pas le temps de traitement des données en post production.

#### Post-production

- Lecture des fichiers sur Stream2D puis correction des données sur le logiciel ParabolPost

### Utilisation des logiciels Stream2D et ParabolPOST

**Rappel :** Pour 1 bordure avec image qui ne bouge pas (=bordure fixe)

les x films seront interprétés automatiquement par le logiciel en 1 seul temps

il faut pouvoir les identifier donc faire un effort sur les noms de fichier

supprimer les copies qui sont inutiles, garder les .seq et .xml

Ce qui compte c'est le nombre de billes totales qui passent tangentielle à la bordure

Si possible de trajectoire différente

#### **Créer l'interprétation initiale des vidéos enregistrées**

- Ouvrir StreamD
- Cliquer sur ouvrir
- Choisir l'ensemble des films réalisés sur 1 bordure figée qui ne bouge pas
- Cliquer sur ouvrir
- Cliquer sur démarrer procédure
- Choisir les points qui délimitent la bordure ciliée
- Définir le côté où sont les cellules
- Puis adapter le contraste pour bien identifier en blanc les billes que l'on a identifier.
- Lancer l'interprétation des datas

#### **Traitement des films :**

Ouvrir le ppt qui s'est créé automatiquement (au fur et à mesure des conditions le ppt sera implémenté, jamais écrasé)

- ➔ Permet d'identifier les billes qu'il faudra supprimer en post production
- ➔ Le ppt fournit 1 graphe pour l'ensemble des films pour 1 condition
- ➔ Graphe de la vitesse ( $\mu\text{m/s}$ ) en fonction de la distance ( $\mu\text{m}$ )
- ➔ + la pente est parallèle à l'axe des ordonnées (= i.e. plus la variation de vitesse proche de la paroi est importante), + il y a de contraintes (=i.e. de frottements)
- ➔ Si la droite est parallèle à l'axe des de l'abscisse, alors il n'y a pas de frottements
- ➔ LA DATA MAJEURE : Index (= shear stress = valeur de la contrainte tangentielle, unité = mPa)
- ➔ h correspond à la distance à la bordure à laquelle la vitesse est nulle
- ➔ Umes = vitesse max à la bordure

#### **Post production une fois le .csv et .ppt généré par interprétation des films concernant la même condition :**

- Ouvrir le fichier resultatsbeads.csv
- Modifier ce qu'on veut supprimer (ce ne sont pas des billes) : coder 0 au lieu de 1
- Puis ouvrir le logiciel ParabolPOST
- Sélectionner le fichier resultatsbeads.csv que l'on vient de modifier
  - Cela implémente directement le ppt initial en rajoutant la nouvelle courbe

# Annexe 12



## Annexe 12

### Protocole de l'étude de la réparation épithéliale après blessure mécanique

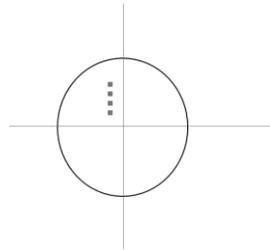
#### Matériel :

- Pipette Pasteur à pointes ouvertes, 230 mm, 250 pièces (référence : PP231).
- Falcon de 50ml/ Falcon de 15ml : 1 par IL testé à 100ng/ml
- EVOM kit : EVOM 3 + 1 puit coaté en collagène + clé USB compatible EVOM + Eau stérile et Alcool + pédale + 1 puit neutre coaté en collagène pour faire le zéro
- Milieu nécessaire : Milieu de Transport
- Interleukines : stocké au -80°C

#### Exemple pour une manip débuté un lundi

- ➔ Préparer les solutions d'interleukines et de contrôle : Milieu de Transport (DMEM F12 PFSG)
- ➔ Faire EVOM de contrôle pré-blessure
- ➔ Faire blessure avec cône de pipette 200µL bien localisé en 1 FOIS
- ➔ LAVAGE doux au PBS\*3 pour enlever les débris cellulaires (hyper important)
- ➔ Faire un marquage au marqueur un peu épais sur le fond de la plaque pour identifier la zone de blessure mais ne pas gêner aux photos.

En pratique : faire une croix au dos de la boîte après l'EVOM quand puits vide, très précisément au contact de la blessure réalisée, pour pouvoir positionner la croix toujours au même endroit et faire la photo. La blessure doit être fine et longue, une rayure. Le bord latéral de la blessure doit être bien marqué par le feutre.



- ➔ Déposer 1ml de la solution contenant l'IL au pôle basal = EXPOSITION PLAQUE à 15h00
- ➔ Puis faire photo de la blessure sous microscope en salle de microscope = T0  
Microscope pour enregistrement de billes, Objx40.  
Toujours regarder la photo prise au temps d'avant pour vérifier qu'on est au même endroit.
- ➔ Mettre la plaque toujours dans le même sens : La position A1 en haut et à droite.
- ➔ Enregistrement de l'image : StreamPix > Changer File Name > T1 à T5 > \manip > \Condition
- ➔ Puis mettre à l'incubateur en salle de microscope (bien allumer le CO<sub>2</sub> et vérifier 5%)

#### Séquence d'expérimentation ensuite

- 1) Le lundi = T0 à 15h, exposition des CENH aux ILs après la blessure
- 2) Mesure du temps de fermeture par vidéomicroscopie avec clichés à intervalle réguliers  
T0 : juste après avoir lavé au PBS à 15h00  
T1 : J1 à +18H (09h du matin le mardi)  
T2 : J1 à +24h donc 15h00 le mardi  
T3 : J2 à +42h donc 09h du matin le 2<sup>ème</sup> jour, donc le mercredi  
T4 : J2 à +48h donc 15h00 le mercredi (les puits contrôles doivent être cicatrisés)
- 3) Evaluation du temps de fermeture par logiciel IMAGE-J

Note : La blessure est normalement fermée en 36-48h



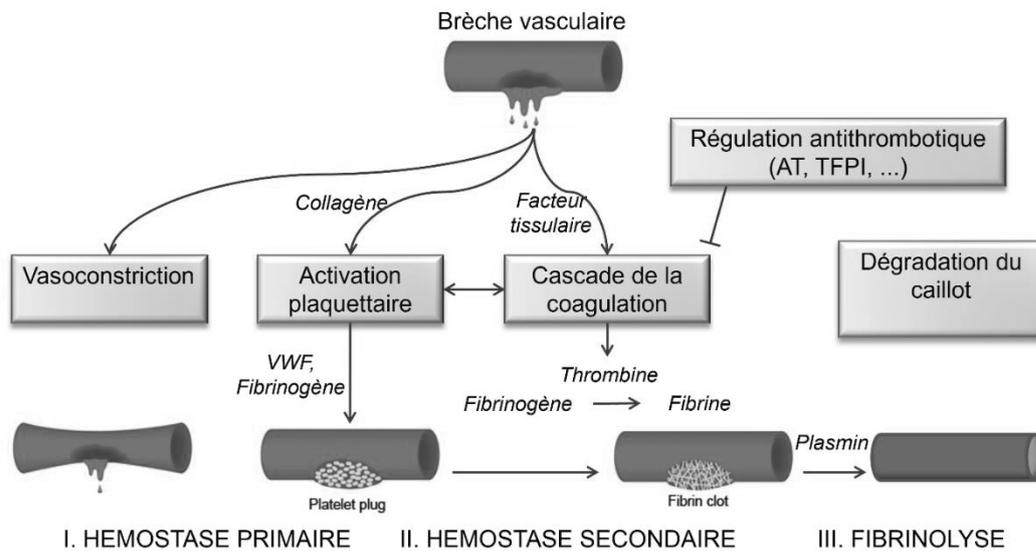
# Annexe 13



## 1. Rappels : Hémostase

### a. L'hémostase primaire

Le processus d'hémostase primaire se met en jeu dès qu'une brèche vasculaire se constitue, impliquant plusieurs types de cellules, les cellules endothéliales vasculaires, le sous endothélium et les plaquettes, ainsi que des protéines plasmatiques telles que le facteur de Von Willebrand (FvW) et le fibrinogène (Fbg). L'hémostase primaire ferme la brèche vasculaire grâce à la formation du clou plaquettaire, selon un processus décrit en trois temps (**Figure 1**). En premier lieu, la vasoconstriction, qui ralentit le flux sanguin, puis l'adhésion des plaquettes à la structure sous endothéliale mise à nue par la brèche vasculaire et leur activation notamment en changeant la conformation des intégrines  $\alpha IIb\beta 3$  et  $\beta III$  qui vont adopter une conformation ouverte active. Les molécules de Fbg viennent se loger entre les deux intégrines  $\alpha IIb\beta 3$  et  $\beta III$  de 2 plaquettes adjacentes, constituant le phénomène d'agrégation plaquettaire. A noter que les plaquettes vont aussi jouer un rôle pro-coagulant grâce à leurs phospholipides (PLs) anioniques exposés par un phénomène de flip-flop membranaire au moment de leur activation. Les PLs serviront alors de surface de catalyse aux réactions de la coagulation.



**Figure 1. Représentation schématique de l'hémostase primaire, secondaire et de la fibrinolyse**

*Légendes : L'hémostase primaire ralentit le flux sanguin par vasoconstriction et met en jeu les plaquettes et le sous endothélium afin de colmater la brèche vasculaire par la formation d'un clou plaquettaire. La coagulation consolide le thrombus plaquettaire en constituant un réseau de fibrine insoluble, formant ainsi un caillot sanguin. La fibrinolyse qui dégrade ultérieurement le caillot au fur et à mesure que la paroi vasculaire se réimperméabilise.*

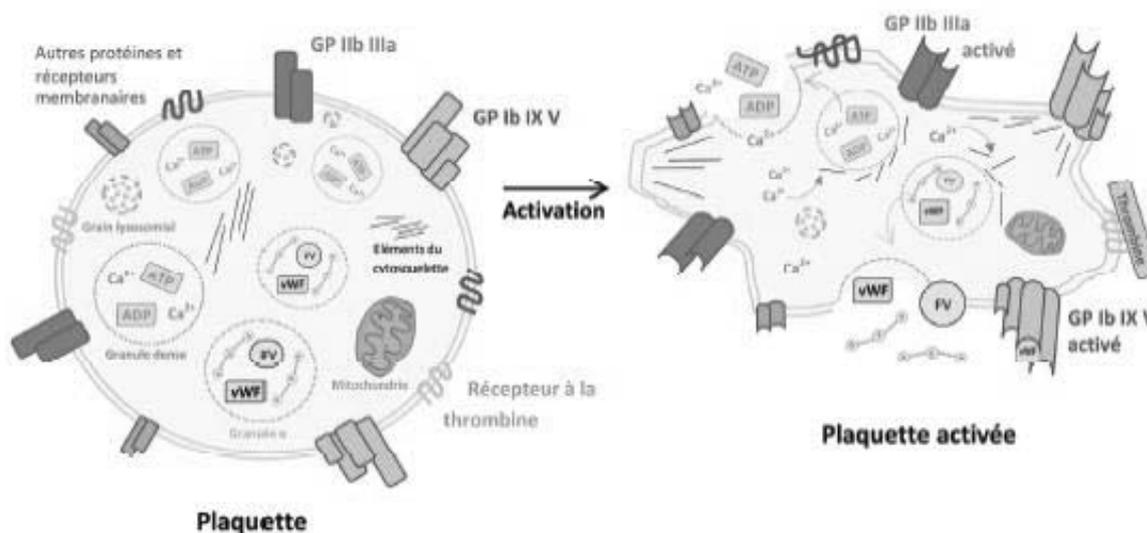
*Abbreviations: AT, Antithrombin; TFPI, tissue factor pathway inhibitor*

*Source : archives du Dr. Sandra Le Quellec, MCU-PH, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL*

Les pathologies plaquettaires (thrombopénies et thrombopathies) et la maladie de Willebrand sont des troubles hémorragiques fréquents et renvoient à des dysfonctionnements de l'hémostase primaire à l'origine de saignements de type cutanéomuqueux (Favaloro *et al.* 2014).

b. La coagulation

La coagulation permet la consolidation du thrombus plaquettaire formé au cours de l'hémostase primaire. En effet, le thrombus plaquettaire est fragile et doit être consolidée par le caillot de fibrine généré par la coagulation et retenant les éléments figurés du sang, constituant ainsi le caillot sanguin. La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques réalisée par des facteurs de la coagulation, survenant à la surface des PLs membranaires des plaquettes activées (**Figure 2**), des cellules endothéliales ou des monocytes et qui aboutissent à la formation de thrombine. Cette enzyme clé transforme le Fbg en Fibrine (Fbn) constituant le caillot sanguin.



**Figure 2. Représentation schématique d'une plaquette et de ses principaux constituants.**

*Légendes : Représentation schématique d'une plaquette et de son changement de conformation, y compris le flip-flop membranaire secondaire à son activation qui joue un rôle majeur en exposant les PLs membranaires.*

*Abbreviations : GP, glycoprotéine ; ATP, Adénosine Triphosphate ; vWF, Facteur de von Willebrand ; FV, Facteur V*

*Source : Archives du Dr Emilie Perrot, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL*

Classiquement, le phénomène de coagulation était décrit selon 3 voies d'activations. Ce concept est utile pour l'interprétation de son exploration biologique *in vitro*, mais reflète peu le déroulement physiologique de l'hémostase *in vivo*. Avant de détailler le processus de coagulation, ci-dessous un rappel des principaux facteurs de la coagulation et leurs caractéristiques (**Tableau 1**).

Facteurs	Fonction	Synthèse	Demi-vie	Concentration plasmatique ( $\mu\text{g/ml}$ )	Poids (kDa)
Fibrinogène	Formation du caillot		4-6jours	3000	330
Prothrombine	Fibrinoformation Activation du FV, FVIII, FXI, FXIII, protéine C, plaquettes	Vit K dpte	3-4jours	90	72
Facteur V	Cofacteur FXa		12-36h	10	330
Facteur VII	Activation FIX, FX	Vit K dpte	4-6h	0,5	50
Facteur VIII	Cofacteur FIXa		10-16h	0,1	330
Facteur IX	Activation FX	Vit K dpte	24h	5	56
Facteur X	Activation FII	Vit K dpte	1-2jours	8	59
Facteur XI	Activation FIX		1-2jours	5	160
Facteur XII	Activation contacte		2-3jours	30	80
Facteur XIII	Fibrinoformation		3-6jours	10	320

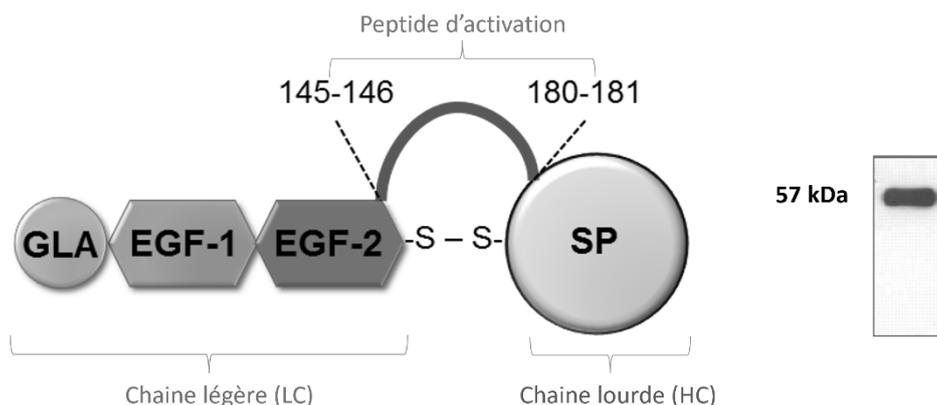
**Tableau 1. Synthèse des facteurs de la coagulation et leurs principales caractéristiques.**

*Légendes :Le poids moléculaire est donné en kilo dalton (kDa).*

*Abréviations : Vit K, vitamine K ; FV, Facteur V (valable pour les tous les facteurs) ; dpte, dépendante*

*Source : Encyclopédie médico-chirurgicale - Hémostase : physiologie et principaux tests d'exploration. 2020. doi : 10.1016/S1634-6939(20)86402-3*

Ils sont essentiellement synthétisés par les hépatocytes sous forme de proenzymes. Les facteurs II, VII, IX (**Figure 3**) et X possèdent des domaines riches en résidus  $\gamma$ -carboxylés, indispensables à la fixation de ces facteurs à la surface des plaquettes activées. Le cofacteur de la  $\gamma$ -carboxylase est la vitamine K réduite  $\text{KH}_2$ , ce qui explique que la synthèse des facteurs précédemment mentionnés soit vitamine K dépendante (Presnell et Stafford 2002).



**Figure 3. Représentation schématique de la structure primaire du FIX**

*Abréviations :GLA, Domaine composé de 39 résidus issus de la traduction des exons 2 et 3 et caractérisé par la présence de 12 acides  $\gamma$  carboxyglutamiques qui interagissent avec les plaquettes, le FVIIIa et le FVIIa-FT; EGF 1&2, 2 domaines en tandem homologue à la structure du facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor); A & C, domaine de la chaîne légère et lourde du FVIII; SP, domaine de la chaîne lourde du FIX*

*Source : archives du Dr. Sandra Le Quellec, MCU-PH, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL*

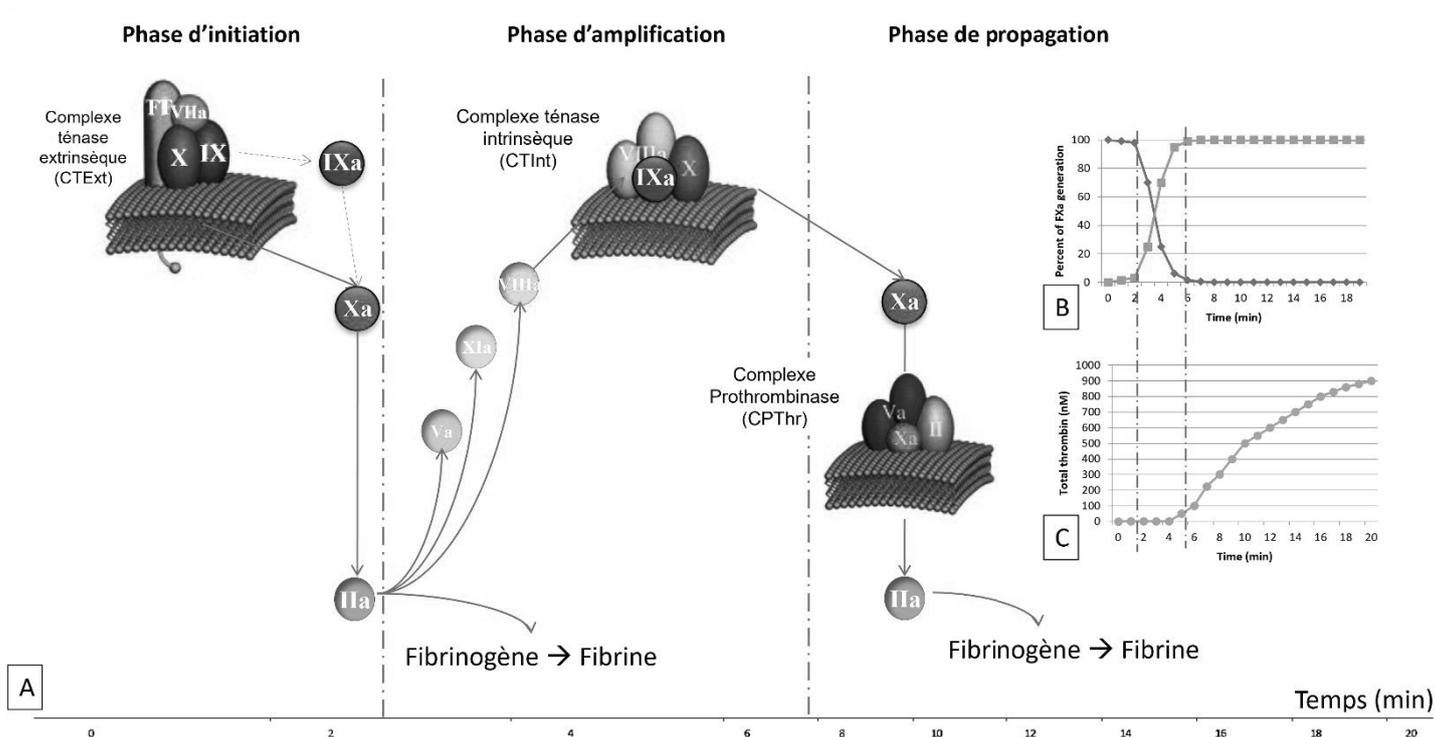
## Annexe 13

Le processus de coagulation *in vivo*, tel qu'il est décrit actuellement peut se décomposer lui-même en 3 phases que sont : la phase d'initiation, la phase d'amplification et la phase de propagation (**Figure 4**).

La **phase d'initiation** conduit au déclenchement de la coagulation par l'expression d'une glycoprotéine transmembranaire, le Facteur Tissulaire (FT). Le FT est un récepteur membranaire, normalement absent des cellules en contact direct avec la circulation sanguine. Il est exprimé constitutionnellement à la surface des cellules musculaires lisses (CML) et des fibroblastes dans le sous-endothélium de la paroi vasculaire. Lorsque le FT se trouve en contact du sang, il se lie au FVII activé (FVIIa) circulant (qui représente 1 à 2% de la concentration totale de FVII), en formant le complexe ténase extrinsèque (CTExt) : FVIIa-FT, en présence de PLs et d'ions  $Ca^{2+}$  (Higashi, Matsumoto, et Iwanaga 1996; Higashi et Iwanaga 1998). Le FVIIa est une sérine protéase, dont l'activité protéolytique ne s'exprime qu'en présence de FT. Le complexe FVIIa-FT active le FX en FXa directement ou indirectement via l'activation préalable de FIX en FIXa. La génération de FXa active la prothrombine (PThr) et aboutit à la génération de faibles traces initiales de thrombine (concentration picomolaire) (**Figure 4C**) .

La thrombine générée amplifie sa propre production en activant aussi les cofacteurs, le FVIII (Fay 2004), le FV (Suzuki *et al.* 2006), le FXI (Matafonov *et al.* 2011) et les plaquettes (Monroe et Hoffman 2006). Cette **phase d'amplification** aboutit à l'accumulation de facteurs de la coagulation activés à la surface des plaquettes et à l'accélération du processus de la coagulation.

Au cours de la 3<sup>ème</sup> et dernière phase, **la phase de propagation**, le FVIIIa en se liant au FIXa aux PLs et au  $Ca^{2+}$ , forme le complexe ténase intrinsèque (CTInt), qui constitue le principal activateur du FX puisqu'il active 50 fois plus le FX que le CTExt (Mann, Butenas, et Brummel 2003). Le FVIIIa joue le rôle de cofacteur du FIXa. Ainsi plus de 90% du FXa produit est issu de son activation par le CTInt. La génération de FXa permet l'assemblage du complexe prothrombinase contenant aussi le cofacteur du FXa, le FVa, des PLs et du  $Ca^{2+}$  qui active la PThr en thrombine 300 000 fois plus efficacement que le FXa seul durant la phase d'initiation. Ainsi, plus de 96% de la thrombine est produite pendant la phase de propagation. L'assemblage de complexes enzymatiques à la surface des plaquettes provoque une génération de forte concentration de thrombine. Le principal substrat de la thrombine est le Fbg. Une molécule de thrombine peut coaguler 1000 fois son poids de Fbg en Fbn. Elle active également le FXIII en FXIIIa, or ce dernier est une transglutaminase qui stabilise le caillot de Fbn en le rendant insoluble finalisant ainsi le processus de coagulation (**Figure 4**) (Ariëns *et al.* 2002).



**Figure 4. Représentation schématique du processus de la coagulation**

*Légendes : (A) Les 3 phases de la coagulation sont représentées, la phase d'initiation, d'amplification et de propagation avec les notions de temps en minutes. (B) Au cours de ces 3 phases la proportion de FXa généré est représentée sur le graphique en haut à droite, avec le détail du complexe d'origine de sa production, le complexe ténase extrinsèque au début (courbe bleu), puis le complexe ténase intrinsèque (courbe orange). (C) La proportion de thrombine généré est représentée sur le 2<sup>ème</sup> graphique (courbe grise). L'abscisse des 3 graphiques (A, B et C) correspond aux temps en minutes. L'écart entre les points n'est pas homogène pour la figure A en raison de la taille des schémas représentant les complexes protéiques de la coagulation.*

*Abréviations : CTExt, Complexe ténase extrinsèque ; CTInt, Complexe Ténase Intrinsèque ; CPThr, Complexe Prothrombinase ; IIa, Facteur II activé ; FT, Facteur Tissulaire.*

*Source : archives du Dr. Sandra Le Quellec, MCU-PH, EA Hémostase, Hôpital Cardiologique, HCL*

## Annexe 13

Du fait du taux de PThr circulante au moins 100 fois plus élevé que celui nécessaire pour la formation du caillot, le système de la coagulation a besoin d'être régulé par un système anticoagulant. Trois systèmes inhibiteurs sont reconnus dans le système anticoagulant et sont responsables de la phase terminale de la coagulation : l'antithrombine (AT), l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*) et la voie de la protéine C-protéine S (PC-PS). Le principal inhibiteur du système anticoagulant est l'AT (Rao *et al.* 1995). Elle inhibe principalement la thrombine mais aussi le FXa, le FIXa et partiellement le FXIa et le FXIIa. Son activité anticoagulante est augmentée environ 100 fois par les héparinoïdes dont l'héparine et les héparanes sulfates de la membrane des cellules endothéliales vasculaires (Mertens *et al.* 1992). Le TFPI inhibe l'activité du complexe FVIIa-FT, de manière dépendante de la concentration en FXa (Hackeng *et al.* 2006; Hackeng et Rosing 2009). La voie de la PC comprend la PC activée par la thrombine, la thrombine, la thrombomoduline et la PS (Stavenuiter, Bouwens, et Mosnier 2013; Wildhagen *et al.* 2011). Après que la PCa ait été générée, elle va s'associer à son co-facteur, la PS, à la surface des plaquettes ou de l'endothélium. Le complexe PCa-PS inhibe la génération de thrombine en inactivant le FVa et le FVIIIa.

Par la diversité des protéines et éléments cellulaires impliqués dans la coagulation et sa régulation, les pathologies associées à ces mécanismes sont nombreuses et variées. Les symptômes sont également très hétérogènes avec d'une part les troubles hémorragiques (déficit quantitatif ou qualitatifs en facteurs de la coagulation, dont l'HA et l'HB) et d'autre part les troubles thrombotiques (thrombophilie héréditaire ou acquise comme le syndrome des anti-PLs).

### c. La fibrinolyse

La fibrinolyse permet d'éliminer le caillot de fibrine constitué à la suite de l'hémostase primaire et à la coagulation au fur et à mesure que la paroi du vaisseau cicatrise et retrouve pleinement ses fonctions imperméabilisantes (Cesarman-Maus et Hajjar 2005). Elle est le phénomène responsable de la lyse du caillot, contrôlée par un phénomène d'activation en phase solide au niveau du caillot, et un phénomène d'inhibition en phase liquide dans le plasma circulant. Après la formation de la fibrine, le plasminogène qui vient se lier de manière covalente à la fibrine au niveau d'un site de liaison contenant des lysines, est activé en plasmine, par deux activateurs : l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase. La plasmine est une enzyme puissante qui clive le réseau de fibrine et libère des produits de dégradation de la fibrine de tailles moléculaires variables (dont les D-Dimères). Tout comme le système de coagulation, le système fibrinolytique possède des inhibiteurs dont les principaux sont l' $\alpha_2$ -antitrypsine, le TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) et le PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*) (Cesarman-Maus et Hajjar 2005).

Une tendance thrombotique peut-être observée par défaut de fibrinolyse ou par anomalie du plasminogène. Au contraire un excès de fibrinolyse provoque des hémorragies, il peut être secondaire à un excès d'activation ou un défaut d'inhibition, c'est le cas des déficits en PAI-1. Il faut alors traiter les patients avec des anti-fibrinolytiques (Cesarman-Maus et Hajjar 2005).

### d. Références

- Ariëns, Robert A. S., Thung-Shenq Lai, John W. Weisel, Charles S. Greenberg, et Peter J. Grant. 2002. « Role of Factor XIII in Fibrin Clot Formation and Effects of Genetic Polymorphisms ». *Blood* 100 (3): 743-54. <https://doi.org/10.1182/blood.v100.3.743>.
- Cesarman-Maus, Gabriela, et Katherine A. Hajjar. 2005. « Molecular Mechanisms of Fibrinolysis ». *British Journal of Haematology* 129 (3): 307-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x>.
- Favaloro, E. J., I. Bodó, S. J. Israels, et S. A. Brown. 2014. « Von Willebrand Disease and Platelet Disorders ». *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia* 20 Suppl 4 (mai): 59-64. <https://doi.org/10.1111/hae.12414>.
- Fay, Philip J. 2004. « Activation of Factor VIII and Mechanisms of Cofactor Action ». *Blood Reviews* 18 (1): 1-15. [https://doi.org/10.1016/s0268-960x\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/s0268-960x(03)00025-0).
- Hackeng, Tilman M., et Jan Rosing. 2009. « Protein S as Cofactor for TFPI ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (12): 2015-20. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.177436>.
- Hackeng, Tilman M., Kristin M. Seré, Guido Tans, et Jan Rosing. 2006. « Protein S Stimulates Inhibition of the Tissue Factor Pathway by Tissue Factor Pathway Inhibitor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (9): 3106-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504240103>.
- Higashi, S., et S. Iwanaga. 1998. « Molecular Interaction between Factor VII and Tissue Factor ». *International Journal of Hematology* 67 (3): 229-41. [https://doi.org/10.1016/s0925-5710\(98\)00018-8](https://doi.org/10.1016/s0925-5710(98)00018-8).
- Higashi, S., N. Matsumoto, et S. Iwanaga. 1996. « Molecular Mechanism of Tissue Factor-Mediated Acceleration of Factor VIIa Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (43): 26569-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.43.26569>.
- Mann, Kenneth G., Saulius Butenas, et Kathleen Brummel. 2003. « The Dynamics of Thrombin Formation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (1): 17-25. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000046238.23903.fc>.
- Matafonov, Anton, Suryakala Sarilla, Mao-fu Sun, John P. Sheehan, Vladimir Serebrov, Ingrid M. Verhamme, et David Gailani. 2011. « Activation of Factor XI by Products of Prothrombin Activation ». *Blood* 118 (2): 437-45. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312983>.
- Mertens, G., J. J. Cassiman, H. Van den Berghe, J. Vermynen, et G. David. 1992. « Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans from Human Vascular Endothelial Cells. Core Protein Characterization and Antithrombin III Binding Properties ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (28): 20435-43.
- Monroe, Dougald M., et Maureen Hoffman. 2006. « What Does It Take to Make the Perfect Clot? ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (1): 41-48. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83>.
- Presnell, Steven R., et Darrel W. Stafford. 2002. « The Vitamin K-Dependent Carboxylase ». *Thrombosis and Haemostasis* 87 (6): 937-46.
- Rao, L. V., O. Nordfang, A. D. Hoang, et U. R. Pendurthi. 1995. « Mechanism of Antithrombin III Inhibition of Factor VIIa/Tissue Factor Activity on Cell Surfaces. Comparison with Tissue Factor Pathway Inhibitor/Factor Xa-Induced Inhibition of Factor VIIa/Tissue Factor Activity ». *Blood* 85 (1): 121-29.
- Stavenuiter, Fabian, Eveline A. M. Bouwens, et Laurent O. Mosnier. 2013. « Down-Regulation of the Clotting Cascade by the Protein C Pathway ». *Hematology Education. European Hematology Association. Congress. Education Program* 7 (1): 365-74.
- Suzuki, H., M. Shima, K. Nogami, Y. Sakurai, K. Nishiya, E. L. Saenko, I. Tanaka, et A. Yoshioka. 2006. « Factor V C2 Domain Contains a Major Thrombin-Binding Site Responsible for Thrombin-Catalyzed Factor V Activation ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 4 (6): 1354-60. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01957.x>.
- Wildhagen, Karin C. A. A., Esther Lutgens, Sarah T. G. B. Loubele, Hugo ten Cate, et Gerry A. F. Nicolaes. 2011. « The Structure-Function Relationship of Activated Protein C. Lessons from Natural and Engineered Mutations ». *Thrombosis and Haemostasis* 106 (6): 1034-45. <https://doi.org/10.1160/TH11-08-0522>.



# Annexe 14



## Annexe 14

### Protocole ELISA – Kit Asserachrom

**Objectif thérapeutique (chez l'homme):** Maintenir le taux résiduel de FVIII:C/FIX:C >1%

**Correspondance dilution :**

Correspondance UI/kg, UI/dL, ng/ml

100 UI/kg administré en IV -> Recovery à 5minutes = 80% de la masse administré = 80UI/dL

100UI/dL = 5µg/ml = 5000pg/ml

Donc :

Lorsqu'on administre 100UI/kg à une souris de 30g, soit 3UI en IV

On devrait récupérer à 5minutes après administration, 80%, soit 80UI/ml

Lorsqu'on administre 10UI à une souris en IN, à 5 minutes, Sandra récupère 6% (6UI/dL)

Manip du 03 et 07/06/2022 -> à 15minute on a récupéré = 2%

Le Taux de FVIII:C/FIX:C est exprimée en % (ou en UI/dL)

**Objectif thérapeutique (chez l'homme):** Maintenir le taux résiduel de FVIII:C/FIX:C >1%

Administration	UI/kg	UI/dL	%	ng/ml	µg/ml
Théorique	125	100	100	5000	5
IV à 5min	100	80	80	4000	4
IN à 5min		6	6	300	0.3
IV à 15min		50	50	2500	
IN à 15min		2	2	100	0.1

**Attention :** Souris de 22-26g (pas 30g)

100	1000
2.2	22
2.5	25
3	22

Donc on a administré (3/22\*1000) 137UI/kg chez les souris pour l'IV  
On cible : 4584ng/ml à 5 minutes après une IV de 3UI chez un souris de 22g  
Calculer un poids moyen pour le groupe de souris qui a le même âge/même poids

**Dilution :**

A partir des résultats des ELISA de 002\_rFIX\_WT\_INSL\_0306 et 003\_rFIX\_WT\_INSL\_0706

IV : 1/500

IN : 1/10

SL (liquide ou sublingual) : 1/10

**Gamme :** de 20 000 à 0 en 6 points ; Ctrl (+) haut à 1/204 et bas à 1/2040

S1 (solution mère) = 20,4µL R6 + 1ml de R4 = [98 000 pg/ml]

S2 = 200µL de S1 + 800µL de R4 = 1ml à [20 000 pg/ml] (196µL dans 804....)

S3 = 150µL de S1 + 850µL de R4 = 1ml à [15 000 pg/ml]

S4 = 100µL de S1 + 900µL de R4 = 1ml à [10 000 pg/ml]

S5 = 50µL de S1 + 950µL de R4 = 1ml à [5 000 pg/ml]

S6 = 10µL de S1 + 990µL de R4 = 1ml à [1 000 pg/ml]

S7 = Contrôle négatif = 200µL de R4 à [0 pg/ml]

**Ctrl positif:**

S1 = 20µL de R7 + 1ml de R4 = 1ml à 1/51<sup>e</sup>

S2 = 200µL de S1 + 600µL de R4 = 800µL à 1/204<sup>e+</sup> → Contrôle positif haut

S3 = 200µL de S2 + 800µL de R4 = 1ml à 1/2040<sup>e</sup> → Contrôle positif bas



# Annexe 15

## SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

### Equipment

Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Ref 1658004
Power-Pac Basic Power Supply	Bio-Rad Ref 1645050

### Material and reagents

Mini-Protean TGX 4-15% 10well 30µl	Bio-Rad Ref 4561083
Mini-Protean TGX 4-15% 10well 50µl	Bio-Rad Ref 4561084
βmercaptoéthanol	Bio-Rad Ref 1610710
4X Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Ref 1610747
Page Ruler 10-180kDa	Life Tech Ref 26616
Running buffer TG-SDS 10X	Euromedex Ref EU0510

### Protocol

Sample preparation Prepare 1ml of 4X Sample Buffer: 900µl 4X Laemmli Sample Buffer + 100µl βmercaptoethanol (store +4°C for 1 month).  
Dilute your sample in 4X Sample Buffer (75µl sample + 25µl 4X Sample Buffer).  
Block the lid of your tubes with a tube locker.  
Heat your samples for 10mn at 96°C.  
Cool them at room temperature 10mn.

Gel preparation Prepare 1x Running Buffer TG SDS.  
Prepare your precast gel as described by the manufacturer (see Documentation).  
**Do not forget to remove bottom strip.**

Sample loading Load 20µl of each sample into each well.  
(Usually, 1µg of protein/well is sufficient to see specific bands).  
Load 10µl of Protein Ladder on each gel.

Running conditions Apply 200v constant (see Documentation).

Usually, you have to stop the migration when the dye front reaches the line at the bottom of the cassette.

## **Western-blot**

### **Equipment**

Trans-Blot Turbo Transfer System Bio-Rad Ref 1704150  
Microplate shaker

### **Material and reagents**

Trans-Blot Turbo Mini 0.2µm NC Transfer pack Bio-Rad Ref 1704158  
Eau OTEC UGAP Ref 2519503  
DPBS 10x Life Tech Ref 14190185  
Lait écrémé UGAP Ref 2516188  
PBS 10x (washing buffer only) Euromedex Ref ET330  
Tween 20 Euromedex Ref 2001-B  
BioFX BCIP/NBT Purple One Component AP Membrane Substrate Euromedex Ref BCID-0100-01

### **Protocol**

Transfer Apply your polyacrylamide gel onto the transblot turbo transfer pack as described by the manufacturer (see Documentation).  
Transfer according to the selected protocol.  
Be careful: the transfer begins immediately. So never remove the membrane from the gel after contact between them.

Blocking Put the membrane in 10ml of DPBS-milk 6%.  
Incubate 30mn at room temperature with gentle shaking.

Primary Ab Put the membrane in 6ml of diluted Primary Antibody (usually at 1µg/ml) in DPBS-milk 1%. Incubate 1h at room temperature with gentle shaking.

Washing Put the membrane in 20ml of PBS-Tween 0.05% for 10mn with shaking. Repeat twice.

Secondary Ab Put the membrane in 6ml of diluted AP-Conjugated Antibody (usually at 1/1000) in DPBS-milk 1%. Incubate 1h at room temperature with gentle shaking.

Washing Put the membrane in 20ml of PBS-Tween 0.05% for 10mn with shaking. Repeat twice.

Revelation Immerse the membrane in ready-to-use AP substrate  
Incubate 10-20mn at room temperature, in the dark.

Stop Rinse the membrane with distilled water.  
Dry between 2 tissues.



# Annexe 16



## BIOPHEN™ FIX

REF 221801 R1 R2 R3 2 x 1 mL; R4 2 x 15 mL

REF 221802 R1 R2 R3 2 x 2,5 mL; R4 2 x 25 mL

REF 221806 R1 R2 R3 2 x 6 mL; R4 4 x 25 mL

Méthode chromogène pour dosage du Facteur IX  
sur plasma ou concentrés thérapeutiques

Français, dernière révision : 06-2021

**UTILISATION :**

Le coffret BIOPHEN™ FIX est une méthode chromogène proposée pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Facteur IX sur plasma humain citraté ou concentrés thérapeutiques, en utilisant une méthode amidolytique, automatisée ou manuelle.

**RÉSUMÉ ET EXPLICATION :****Technique :**

Le Facteur IX (FIX) est une glycoprotéine vitamine K dépendante, intervenant dans les phases intermédiaires de la coagulation. Sa concentration normale dans le plasma humain est d'environ 4 à 5 µg/mL<sup>1</sup>. Activé par le Facteur XIa, en présence de calcium, le Facteur IX(a) forme un complexe actif avec le Facteur VIII:C, en présence de calcium et phospholipides, qui active le Facteur X en Facteur Xa<sup>2</sup>.

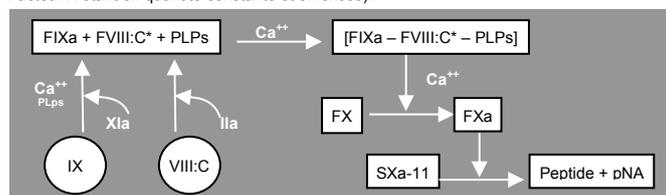
Le coffret BIOPHEN™ FIX est proposé pour le dosage de l'activité du Facteur IX sur plasma ou concentrés thérapeutiques<sup>3,4</sup>.

**Clinique :**

Un déficit en Facteur IX (ou facteur anti-hémophilique B) entraîne la pathologie de l'hémophilie B, trouble de la coagulation congénital<sup>5,6,7,8,9</sup>. Le taux de Facteur IX est diminué chez les patients sous traitement anti-vitamine K, ou dans les pathologies comme les atteintes hépatiques, cirrhose, CIVD. Des concentrations élevées de Facteur IX pourraient être un indicateur de risque accru de thrombose veineuse<sup>10</sup>.

**PRINCIPE :**

La méthode BIOPHEN™ FIX est un dosage chromogène de l'activité du Facteur IX (FIX). En présence de phospholipides (PLPs) et calcium, le Facteur XIa (FXIa) active le FIX, présent dans l'échantillon testé, en Facteur IX activé. Le Facteur VIII:C activé (FVIIIa) par la thrombine forme un complexe enzymatique avec le Facteur IXa pour activer le Facteur X. Le Facteur Xa ainsi formé hydrolyse le substrat chromogène qui libère de la paranitroaniline (pNA). La quantité de pNA libérée (mesurée par l'Absorbance à 405nm) est directement proportionnelle à la concentration de Facteur IX dans l'échantillon (le Facteur XIa, le Facteur VIII:C et le Facteur X étant en quantité constante et en excès).



*Nota :* FVIII:C\* : FVIII:C activé par la thrombine.

**REACTIFS :**

**R1 Réactif 1 : FX(h)-FVIII:C :** Facteur X humain, et FVIII:C, lyophilisé. Contient du calcium chlorure dihydrate, du sulfate de cuivre, un inhibiteur de polymérisation de la fibrine et des stabilisants.

**R2 Réactif 2 : Réactif activateur :** lyophilisé. Contient du Facteur XIa humain, en quantité constante et optimisée, de la thrombine humaine, du calcium chlorure dihydrate, de l'imidazole, des phospholipides synthétiques et des stabilisants.

**R3 Réactif 3 : Substrat :** Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (SXa-11), lyophilisé. Contient un inhibiteur du Facteur XIa.

**R4 Réactif 4 : Tampon :** Tampon réactionnel Tris-BSA. Contient 1% de BSA, PEG, des stabilisants du Facteur VIII:C et de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L) comme conservateur.

REF 221801 → R1 R2 R3 2 flacons de 1 mL.

R4 2 flacons de 15 mL.

REF 221802 → R1 R2 R3 2 flacons de 2,5 mL.

R4 2 flacons de 25 mL.

REF 221806 → R1 R2 R3 2 flacons de 6 mL.

R4 4 flacons de 25 mL.

**MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :**

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

**PRÉPARATION DES REACTIFS :**

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R1 R2 R3 Reconstituer chaque flacon avec exactement

REF 221801 → 1 mL d'eau distillée.

REF 221802 → 2,5 mL d'eau distillée.

REF 221806 → 6 mL d'eau distillée.

Agiter vigoureusement jusqu'à **dissolution complète** (vérifier l'absence de dépôt sur le fond du flacon R3), en évitant la formation de mousse et charger sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

*Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.*

**R4** Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser et charger sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

*Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.*

**STOCKAGE ET STABILITE :**

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

REF 221802 / 221806 :

**R1 R2** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 24 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois congelé à -20°C ou moins\*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

**R3** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 1 mois à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois congelé à -20°C ou moins\*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

\*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement. Procéder à une nouvelle calibration avec le réactif congelé.

REF 221801 :

**R1 R2 R3** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 24 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

REF 221801 / 221802 / 221806 :

**R4** Dans son emballage d'origine, et conservé à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation.

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

**REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :****Réactifs :**

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Matériel de référence pour dosage des concentrés thérapeutiques en Facteur IX (international ou interne).
- Étalons et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Reference
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

- Pour réaliser l'étalonnage en gamme basse, diluer l'étalon en plasma déficient Facteur IX (DP050A/K).

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

**Matériels :**

- Spectrophotomètre ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées.

**PRÉLEVEMENTS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS :**

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les États-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5<sup>11</sup> pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références<sup>12</sup>.

**PROCÉDURE :**

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est évaluée à 405nm.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

# Annexe 16

## Méthode de dosage

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans du tampon R4 comme décrit ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en Facteur IX):

### Gamme haute (5 à 200%) :

Lorsque la gamme de calibration est réalisée à l'aide d'un plasma étalon commercial (ex : BIOPHEN™ Plasma Calibrator), la dilution au **1/100** correspond à la concentration (C) en Facteur IX indiquée, et le **1/50** à deux fois cette concentration. Pour un étalon titrant C, le taux de 200% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : **50x(C)/100**.

La gamme de calibration peut également être réalisée à l'aide d'un pool de plasma citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connus), qui par définition titre **100%** de Facteur IX. Le dosage intègre une dilution du plasma au **1/100**, qui représente par définition le taux 100% de Facteur IX. La gamme de calibration va de **5 à 200%** de Facteur IX. La dilution au **1/50** en tampon R4 représente **200%** de Facteur IX.

Préparer **2 mL** de la dilution **1/50** du pool de plasmas normaux, ou une dilution (**50x(C)/100**) du plasma étalon tiré en Facteur IX (soit C1). Cette solution titre 200% Facteur IX ; préparer la gamme d'étalonnage suivante par dilutions successives dans le tampon R4 comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration:

Etalon FIX(%)	C1	C2	C3	C4	C5	0
	200	100	50	25	5	0
Volume Etalon	1000µL de C1	500µL de C1	500µL de C2	500µL de C3	100µL de C4	0µL
Volume Tampon R4	0µL	500µL	500µL	500µL	400µL	500µL

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée à partir d'un matériel de référence titré en Facteur IX (standard international ou standard interne).

Prédiluer ce matériel en tampon R4 pour obtenir une solution à **1 UI/mL** puis effectuer une dilution au **1/50** en R4 pour obtenir une solution à **200%** (2UI/mL) de Facteur IX. Effectuer à partir de cette solution une gamme d'étalonnage en tampon R4 comme expliqué précédemment.

### Gamme basse (0 à 20%) :

L'étalonnage peut être réalisé à l'aide d'un pool de plasmas citratés normaux ou d'un plasma étalon commercial à taux de Facteur IX connu, soit C. Diluer ce plasma avec du plasma déficient en Facteur IX (DP050A/K) de façon à obtenir un taux de **20 %** (le facteur de dilution en plasma déficient est de 5 pour le pool normal, ou de **5x(C)/100** pour un étalon à taux C). Le dosage intègre une dilution du plasma au **1/20**. La gamme de calibration va de **1 à 20%** de Facteur IX. La dilution au **1/20** en tampon R4 représente **20%** de Facteur IX.

A partir de cette solution faire la gamme d'étalonnage suivante dans le tampon R4 :

FIX(%)	20	10	5	2,5	1	0
Volume Etalon 20% FIX	500µL	250µL	125µL	65µL	25µL	0µL
Volume Tampon R4	0µL	250µL	375µL	455µL	475µL	500µL

Réaliser la gamme extemporanément afin d'éviter toute dégradation du Facteur IX.

2. Diluer les échantillons dans du tampon R4 comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Gamme	Dilution
Contrôle	223201/223301	Haute	1/100
		Basse (après pré-dilution 1/10 en Déficier IX)	1/20
Echantillons	N.A.	Haute	1/100
		Basse	1/20

Pour les concentrés thérapeutiques de Facteur IX, l'échantillon à tester (en gamme haute) doit être pré-dilué en R4 pour cibler une concentration de Facteur IX d'environ 1 UI/mL. Il est recommandé d'effectuer une pré-dilution, afin d'amener la concentration théorique de Facteur IX entre **0,2 et 2 UI/mL**, puis une dilution **1/100** en R4 pour la réalisation du test. La concentration en Facteur IX attendue se situe ainsi entre 20 et 200%. (La concentration mesurée doit ensuite être multipliée par le facteur de « pré-dilution »).

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le kit.

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à **37°C**:

	Microplaque	Volume
Echantillons, contrôles ou étalons dilués en R4	50 µL	200 µL
<b>R1</b> FIX(H)-VIII:C préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 2 minutes, puis introduire :		
<b>R2</b> Réactif activateur préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 3 minutes puis introduire :		
<b>R3</b> Substrat Sxa-11 préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2 minutes exactement		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%)*	50 µL	200 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

\*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures.  
Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse de celui du test : Acide Citrique (2%), R3, R2, R1, échantillon dilué.  
Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.  
Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les DDO 405 au lieu des DO 405.

### Méthode cinétique :

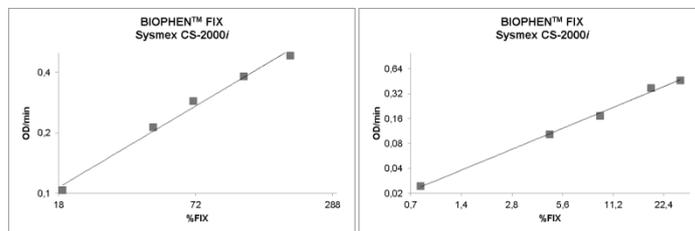
Le dosage peut être réalisé par méthode cinétique en mesurant le changement d'absorbance entre 10 et 100 secondes après l'addition du substrat (soit ΔA405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

### CALIBRATION :

Le test BIOPHEN™ FIX peut être calibré pour le dosage du Facteur IX sur plasmas ou concentrés thérapeutiques. L'étalon plasmatique couvrant la zone de test dynamique est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

Les courbes de calibration ci-dessous sont indiquées à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



### CONTROLE QUALITE :

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs. Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode. Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

### RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration log-log, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de Facteur IX en pourcentage.
- La concentration de Facteur IX (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, si la dilution standard est utilisée.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.
- Si d'autres dilutions sont utilisées, le taux obtenu est le taux mesuré multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.

### LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.

### VALEURS ATTENDUES :

La valeur normale en Facteur IX d'un plasma adulte est généralement comprise entre 73 et 167% (Sysmex CS-5100). Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

### PERFORMANCES :

- La limite basse de détection sur automate est inférieure à **2% en gamme haute** et inférieure à **0,5% en gamme basse**.
- Le domaine de mesure sur Sysmex CS-2000i est compris entre **1 et 250%** pour la gamme haute, et **0,8 à 30%** pour la gamme basse (et habituellement autour de **5 à 200 %** en gamme haute, et **1 à 20%** en gamme basse).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur 1 lot de réactif sur Sysmex CS-2000i. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 20 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Gamme haute				Gamme basse							
	Intra-essai		Inter essais		Intra-essai		Inter essais					
	N	Moy. SD	CV%	n	Moy. SD	CV%	n	Moy. SD	CV%			
Normal	30	85,7	1,0	1,2	80	83,1	4,1	4,9	80	8,3	0,5	6,2
Anormal	30	36,5	0,9	2,4	80	35,7	2,0	5,6	80	3,6	0,2	6,4

- Corrélation avec une autre méthode (STA® C.K. PREST® sur STA-R vs BIOPHEN™ FIX sur Sysmex CS-5100) :  
n = 102 y = 0,97x - 0,10 r = 0,983

### Interférences :

Pas d'interférence jusqu'à (Sysmex CS-2000i, gamme haute) :

Intralipides (mg/dL)	Hémoglobines (mg/dL)	Dabigatran (ng/mL)	Bilirubine (F/C) (mg/dL)	Apixaban (ng/mL)	Héparines (HNF/HBPM) (UI/mL)
1000	1000	500	60	50	2

Se référer au guide d'application spécifique.

### REFERENCES :

- Lowe G.D.O. et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers : The third glasgow MONICA survey I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. British Journal of Haematology, 1997, 97, 775-784.
- Taran LD. "Factor IX of the blood coagulation system: a review", Biochemistry (Mosc.), 62(7):685-93, 1997.
- Wagenvoort R. et al., "Development of a sensitive and rapid chromogenic FIX assay for clinical use", Haemostasis, 20(5): 276-88, 1990.
- Bowyer A.E. et al. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. Haemophilia. 2018; 1-6.
- Parekh V.R. et al., "Immunological heterogeneity of haemophilia B: a multicentre study of 98 kindreds", Br J Haematol, 40(4):643:55, 1978.
- Orstavik KH. et al., "Detection of carriers of haemophilia B", Br J Haematol, 42(2):293-301, 1979.
- www.ncbi.nlm.nih.gov, OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520.
- Kitchen S. et al. A computer-based model to assess costs associated with the use of factor VIII and factor IX one-stage and chromogenic activity assays. J Thromb Haemost 2016 ; 14 : 757-764.
- Sorensen M.H. et al. Factor IX deficient plasma spiked with N9-GP behaves similarly to N9-GP post administration clinical samples in N9-GP ELISA and FIX activity assays. Haemophilia (2015), 21, 832-836.
- Van Hylckama Vlieg A. et al., "High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis", Blood, 95(12):3678-82, 2000.
- CLSI Document H21-A5 : "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". Fifth Edition, 28, 5, 2008.
- Mauge L. and Alhenc-Gelas M. Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation: revue des données disponibles. Ann Biol Clin. 2014.

### SYMBLES :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

- R1** H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
- R2** H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.  
H318 : Provoque des lésions oculaires graves.  
H360D : Peut nuire au fœtus.

Changements par rapport à la précédente version.



**Contexte** : Certaines biothérapies ont récemment été suggérées comme une alternative thérapeutique de recours pour la polypose nasosinusienne (PNS). En France actuellement, deux biothérapies (dupilumab et mépolizumab) sont prescriptibles dans la PNS sévère non contrôlée par la corticothérapie orale et la chirurgie mais les termes « sévérité » et « contrôle » ne sont pas consensuels. La PNS, modèle de maladie inflammatoire de type 2, est également considérée comme un modèle de dysrégulation épithéliale dont la pathogénie n'est pas complètement élucidée. L'effet des biothérapies, à l'échelle cellulaire, sur les cellules épithéliales nasales humaines (CENH) n'a pas été exploré et d'autres cibles thérapeutiques pourraient être envisagées. De plus, la voie d'administration sous-cutanée pourrait être une limite à l'efficacité de ces biothérapies. L'administration par voie nasale est un nouveau défi à relever. Récemment, un récepteur (le récepteur néonatal au fragment cristallisable (FcRn) des Ig), jouant un rôle clef dans l'homéostasie des immunoglobulines (Ig), a été mis en évidence au niveau de l'épithélium nasal. Des biothérapies, hors du seul cadre de la PNS, pouvant être reconnues par le FcRn, existent déjà et sont actuellement administrées par voie intraveineuse. Dans le traitement de l'hémophilie B (HB), l'Eftrenonacog alfa (rFIX-Fc) est une biothérapie fusionnée au Fc qui pourrait être administrée par voie nasale.

**Objectif** : L'objectif de cette thèse était de : i/ créer un score composite (clinique, scanographique et biologique) *in silico* visant à déterminer la sévérité de cette maladie ; ii/ caractériser *in vitro* les effets de l'OSM, de l'IL-4, de l'IL-13 et du dupilumab (barrière, efficacité du battement ciliaire et réparation) sur les CENH ; et, iii/ évaluer *in vivo* l'efficacité d'une nouvelle voie d'administration nasale d'une biothérapie (le rFIX-Fc) sur des modèles murins.

**Méthodes** : Une étude nationale prospective multicentrique (étude PSI pour *Polyposis Severity Index*) a été mise en place en France (NCT05056714). Un modèle à variables latentes reliant les différents indicateurs mesurés chez les patients à la sévérité de la PNS a été construit pour générer des équations structurelles. Dans un modèle de cultures primaires de CENH en interface air-liquide, les effets des cytokines (IL-6, OSM, IL-4, et IL-13) et du dupilumab sur les fonctions épithéliales (barrière, efficacité du battement ciliaire et réparation) ont été comparés à des conditions contrôles. Enfin, un protocole expérimental a été mis en place pour faire la preuve du concept de l'administration nasale de rFIX-Fc et étudier le rôle du FcRn à l'aide de modèles murins transgéniques (knock-out (KO) pour le FcRn, KO pour le facteur IX, et humanisé pour le FcRn).

**Résultats** : A ce jour, 417 patients ont pu être inclus dans l'étude PSI et les premières modélisations statistiques seront réalisées dès n=470. *In vitro*, l'OSM, mais pas l'IL-6, a induit une diminution significative de la fonction de barrière et de l'efficacité du battement ciliaire dans les CENH. Après 24 heures, la vitesse de réparation épithéliale après blessure était significativement plus élevée dans les CENH stimulées par l'OSM. *In vitro*, l'IL-4, mais pas l'IL-13, a induit une diminution significative de la fonction de barrière, de l'efficacité du battement ciliaire et de la vitesse de réparation épithéliale après blessures dans les CENH. *In vitro*, le dupilumab n'a eu aucun effet négatif sur les CENH et a restauré toutes les fonctions épithéliales altérées par une exposition des CENH à l'IL-4. *In vivo*, après administration intranasale, le rFIX et rFIX-Fc ont été délivrés de manière équivalente dans le plasma, quelle que soit la souche de souris étudiée, par un mécanisme passif de transport indépendant du FcRn. L'activité du FIX était conservée après passage transmuqueux chez les souris KO pour le FIX.

**Conclusion** : Le modèle PSI devra nous permettre de mieux caractériser la sévérité de la PNS pour cibler les patients éligibles aux biothérapies. Ensuite, nous avons identifié une nouvelle potentielle cible thérapeutique : l'OSM qui induit *in vitro* un dérèglement de la fonction de barrière épithéliale. Le dupilumab est capable, *in vitro*, de restaurer l'ensemble des fonctions épithéliales testées (barrière, clairance mucociliaire et réparation épithéliale) et altérées par l'IL-4, améliorant notre compréhension de son efficacité *in vivo*. Enfin, nous avons démontré un passage sanguin du FIX avec conservation de son activité chez la souris, rendant possible le développement de cette voie d'administration chez l'homme pour le traitement de l'HB et pour d'autres biothérapies comme le dupilumab.