

Modulation des mécanismes inflammatoires impliquant les polynucléaires éosinophiles au cours de la polypose naso-sinusienne associée à l'asthme

Geoffrey Mortuaire

▶ **To cite this version:**

Geoffrey Mortuaire. Modulation des mécanismes inflammatoires impliquant les polynucléaires éosinophiles au cours de la polypose naso-sinusienne associée à l'asthme. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S010 . tel-01259532

HAL Id: tel-01259532

https://theses.hal.science/tel-01259532

Submitted on 20 Jan 2016

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.

UNIVERSITE DE LILLE 2 - DROIT ET SANTE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTE

THESE DE DOCTORAT

Spécialité: Physiologie, Physiopathologie, Biologie systémique médicale

Année: 2015

MODULATION DES MECANISMES INFLAMMATOIRES IMPLIQUANT LES POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES AU COURS DE LA POLYPOSE NASO-SINUSIENNE ASSOCIEE A UN ASTHME

Présentée et soutenue le 20 Mai 2015

Par Geoffrey Mortuaire

Président:	**Mme le Professeur Monique Capron**	Université de Lille 2
Examinateurs:	**Mr le Professeur André Coste**	Université de Créteil
	Mme le Docteur Valérie Gouilleux	Université de Tours
	Mr le Docteur Jean-François Papon	Université de Paris Sud
Co-directeur de thèse:	**Mr le Professeur Lionel Prin**	Université de Lille 2
Directeur de thèse:	**Mr le Professeur Dominique Chevalier**	Université de Lille 2

REMERCIEMENTS

A Mme le Professeur Monique Capron,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse et d'en présider le Jury. Vous avez été l'investigatrice des travaux sur les éosinophiles dans la rhinosinusite chronique. Vous avez permis à l'équipe d'ORL d'intégrer votre équipe et de bénéficier de vos connaissances. Sans votre soutien et votre capacité à fédérer les énergies, ces travaux n'auraient pu aboutir. Je tiens à vous exprimer à travers ma thèse ma plus grande reconnaissance.

A Mr le Professeur André Coste,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites d'accepter de participer au jury de ma thèse. Votre expertise et votre enseignement me sont au quotidien d'une aide précieuse dans la prise en charge des pathologies rhinologiques. Votre intégrité et l'excellence des travaux que vous menez sont des modèles vers lesquels je souhaite tendre dans mon activité universitaire.

A Mr le Professeur Lionel Prin,

Je ne pourrais jamais vous remercier suffisamment pour le soutien inconditionnel et permanent que vous m'avez accordé tout au long de ces années de thèse. Vous avez su comprendre et accepter les difficultés liées à la poursuite de mes activités cliniques durant le doctorat. Vous avez toujours fait en sorte que je puisse bénéficier de l'aide des membres de votre équipe. Vos conseils ont été d'un apport majeur dans l'orientation, la direction et l'aboutissement de ces travaux. Que ce travail soit l'expression de toute ma gratitude à votre égard.

A Mr le Professeur Dominique Chevalier,

Depuis 15 ans, vous avez su toujours me soutenir et me guider dans l'accomplissement de ma carrière professionnelle. Cette thèse est l'un des jalons que vous m'aidez une nouvelle fois à poser. La route est encore longue et incertaine mais je sais pouvoir compter sur vous en toute circonstance. Soyez certain de toute ma reconnaissance et de ma présence à vos côtés pour mener à bien les projets du service.

A Mme le Docteur Valérie Gouilleux,

Je vous remercie pour votre disponibilité tout au long de la thèse et pour vos précieux conseils lors des réunions auxquelles vous avez bien voulu accepter de participer en dépit de votre éloignement. J'espère avoir su répondre aux orientations que vous nous avez suggérées. Permettez-moi de vous exprimer toute ma reconnaissance.

A Mr le Docteur Jean François Papon,

Merci infiniment d'avoir accepté de suivre mon travail sur ces 3 ans. J'espère pouvoir me montrer à la hauteur de l'exemple que tu peux représenter en termes de qualité professionnelle et scientifique. Nous devrions être amenés à nous croiser de nombreuses fois dans l'exercice de la rhinologie. Que cette volonté commune d'améliorer la prise en charge de nos patients soit aussi le lien de l'amitié que j'ai à ton égard.

A Claire, Isabelle, Marie, Maïté et Virginie,

Les mots me manquent pour exprimer la reconnaissance et l'attachement que j'ai à votre égard.

Sans vous, rien n'aurait été possible.

Merci pour toujours.

Aux membres de l'U995, de l'EA 2868 et du LIRIC,

Je vous remercie pour votre accueil et pour l'aide que vous avez pu m'apporter. J'espère pouvoir faire en sorte que la rhinologie devienne une thématique importante dans le champ des maladies inflammatoires que vous explorez au quotidien.

A la mémoire de mon Père …

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....1
SOMMAIRE DES FIGURES.....4
SOMMAIRE DES TABLEAUX.....6
TABLE DES ABREVIATIONS.....7
INTRODUCTION.....8
I. Diagnostic de la polypose naso-sinusienne.....9
II. Physiopathologie de la polypose naso-sinusienne.....11
II.A. Rôle des comorbidités.....11
II.B. Rôle des facteurs environnementaux.....12
II.C. Rôle des agents infectieux.....12
II.C.1. Les agents fongiques.....12
II.C.2. Les virus.....13
II.C.3. Les agents bactériens.....13
II.D. Mise en jeu des mécanismes de l'immunité innée et acquise (ou adaptative).....14
II.D.1. Rôle de l'épithélium nasal.....14
II.D.2. Rôle des acteurs de l'immunité innée.....15
II.D.2.a. Les macrophages.....15
II.D.2.b. Les mastocytes.....15
II.D.2.c. Les neutrophiles.....16
II.D.3. Rôle des acteurs de l'immunité acquise (ou adaptative).....16
II.D.3.a. Les cellules dendritiques.....16
II.D.3.b. Les lymphocytes B et les plasmocytes.....16
II.D.3.c. Les lymphocytes T.....17
II.D.4. Rôle de l'éosinophile.....17
II.D.5. Le remodelage tissulaire.....18
II.E. Rôle des facteurs génétiques.....19
III. Limites thérapeutiques de la polypose naso-sinusienne.....22
III.A. Traitement à visée symptomatique.....22

III.A.1. La corticothérapie 22
III. A.2. La chirurgie 23
III.B. Traitement à visée étiologique 24
III.B.1. Les antimycotiques 25
III.B.2. Les antibiotiques 25
III.B.3. Les antihistaminiques 25
III.B.4. Les antileucotriènes 26
III.B.5. Ciblage de la voie de l'immunité adaptative 26
III.B.5.a. Anti-IgE 26
III.B.5.b. Anti-IL-5 27
IV. Les enjeux de la polypose naso-sinusienne 28
OBJECTIFS 30
MATERIEL ET METHODES 34
I. Population 35
II. Recueil des échantillons 36
III. Purification des eosinophiles sanguins 37
IV. Purification des eosinophiles du polype 37
V. Immunophénotypage des eosinophiles purifiés 40
VI. Mise en culture des eosinophiles purifiés lors des tests fonctionnels *in vitro.* 41
VII. Analyses statistiques. 41
RESULTATS 42
I. OBJECTIF 1 : définir les profils phénotypiques histologiques dans la polypose naso-sinusienne 43
I.A. Contexte 43
I.B. Résultats 43
I.B.1. Population 43
I.B.2. Classification histologique des polypes 44
I.B.3. Relation entre la classification histologique établie et les caractéristiques muqueuses et sous muqueuses du polype 44
I.B.4. Relation entre la classification histologique établie et le statut clinique des patients 45
I.C. Synthèse 45
I.D. Article 1 46

II. OBJECTIF 2: définir les profils phénotypiques biologiques et les facteurs d'immuno-modulation dans la polypose naso-sinusienne 64
II.A. Contexte 64
II.B. Résultats 65
II.B.1. Population 65
II.B.2. Profil phénotypique biologique en relation avec l'asthme 65
II.B.3. Profil phénotypique des éosinophiles en relation avec l'asthme 65
II.B.4. Immuno-modulation IL-5 et IL-9 dépendante et impact sur la survie des éosinophiles 66
II.C. Synthèse 66
II.D. Article 2 68
III. OBJECTIF 3: caractérisation phénotypique protéique dans la polypose naso-sinusienne 93
III.A.Contexte 93
III.B. Mise au point technique 95
III.B.1. Population 95
III.B.2. Méthode de déplétion de l'albumine 96
III.B.3. Analyse des 20 patients par électrophorèse bi-dimensionnelle quantitative (2D DIGE) 97
III. C. Résultats préliminaires 98
III.C.1. Choix de la technique de déplétion de l'albumine 98
III.C.2. Identification de spots d'intérêt 99
III.D. Synthèse 100
DISCUSSION 102
I. Design de l'étude 103
II. Données histologiques 103
III. Rôle de l'éosinophile 105
IV. Rôle de l'environnement cytokinique 106
V. Caractérisation phénotypique 108
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 111
BIBLIOGRAPHIE 114
ANNEXES 125

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1: Aspect endoscopique des polypes dans une fosse nasale droite. 9

Figure 2: Aspect tomodensitométrique de la PNS. 9

Figure 3: Score de taille des polypes selon Lildholdt. 10

Figure 4 : Interactions des différents partenaires de la réponse immunitaire innée et acquise dans l'inflammation observée au cours de la PNS. 21

Figure 5: Aspect postopératoire à 1 an d'une fosse nasale droite après ethmoïdectomie endoscopique. 23

Figure 6: Evolution du taux de pureté des populations d'éosinophiles obtenues par sélection négative sur polype. 38

Figure 7: Comparaison des taux d'éosinophiles avant et après passage de l'homogénat sur colonne de purification. 39

Figure 8: Ciblage de la population éosinophile par double marquage. 40

Figures article 1: Mortuaire *et al. Histopathological classification of refractory chronic rhinosinusitis with nasal polyps.* Histology and Histopathology.

Figure 1 art1: Nasal polyps classification according to eosinophil infiltrate and stromal framework . 59

Figure 2 art1: Microscopical depictions of the nasal polyp classification..... 60

Figure 3 art1: Cells distribution in the 3-subtype nasal polyp classification..... 61

Figure 4 art1: Relation between nasal polyp classification and histopathological features. 62

Figure 5 art1: Stromal cell distribution in nasal polyps according to lower airway status. 63

Figures article 2: Mortuaire *et al. Immune profile modulation of blood and mucosal eosinophils in nasal polyposis with concomitant asthma.* Annals of Allergy, Asthma and Immunology.

Figure 1 art2. Eosinophilia and EDN as inflammatory markers in CRSwNP patients with asthma..... 84

Figure 2 art2. Inflammatory profile of CRSwNP patients with Th2 polarisation in asthmatic patients.85

Figure 3 art2. Adhesion receptor modulation in EOs between the blood and the nasal mucosa compartments. 86

Figure 4 art2. CD69 activation marker and IL-5 receptor alpha modulation in EOs between the blood and the nasal mucosa compartments. 87

Figure 5 art2. IL-5 receptor alpha expression modulation on EOs after 18-hour incubation with different cytokine conditions in asthmatic and non-asthmatic patients. 88

Figure 6 art2. Apoptosis assessment of purified EOs after 18-hour incubation with different cytokine conditions in asthmatic and non-asthmatic patients. 88

Figure 9: Profil de migration selon la masse moléculaire des protéines de sécrétions nasales par électrophorèse SDS-PAGE et profil de migration bi-dimensionelle par isoélectrophorèse et SDS-PAGE. 94

Figure 10: Analyse par migration 1D SDS-PAGE des profils protéiques et immunomarquage par Western Blot anti-HSA..... 98

Figure 11: Analyse quantitative après migration 1D SDS-PAGE de la déplétion de l'albumine par technique d'immuno-affinité. 99

Figure 12: Images représentatives de gels 2D-DIGE comparant les sécrétions nasales des sujets atteints de PNS isolée et de PNS associée à un asthme allergique. 99

Figure 13: Identification par le logiciel SameSpots des spots différentiellement exprimés. 100

Figure 14: Profil phénotypique immuno-inflammatoire au cours de la PNS en fonction du statut asthmatique. 110

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1: Score tomodensitométrique de Lund-Mackay. 10

Tableau 2: Voies de signalisation inflammatoire dans la PNS. 20

Tableau 3 : Comparaison des protocoles de préparation des polypes en vue de la purification des éosinophiles..... 38

Tableaux article 1: Mortuaire *et al. Histopathological classification of refractory chronic rhinosinusitis with nasal polyps.* Histology and Histopathology.

Table 1 art1: Overview of histologic inflammatory markers. 57

Table 2 art1: Demographic and clinical characteristics of the population. 58

Tableau article 2: Mortuaire *et al. Immune profile modulation of blood and mucosal eosinophils in nasal polyposis with concomitant asthma.* Annals of Allergy, Asthma and Immunology.

Table 1 art2: Demographic and clinical description of the study population..... 83

Tableau 4: Population selectionnée pour l'analyse protéomique..... 95

TABLE DES ABREVIATIONS

2D-DIGE	2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis
AINS	anti-inflammatoires non stéroïdiens
BAFF	B-cell activating factor
CCL23	CC chemokine ligand 23
CD44	cluster of differenciation 44
CD69	cluster of differenciation 69
DTT	dithiothréitol
ECP	eosinophil cationic protein
EDN	eosinophil-derived neurotoxin
EO(s)	polynucléaire(s) éosinophile(s)
EPO	eosinophil peroxidase
FOXP3	forkhead box P3
GM-CSF	granulocyte/ macrophage-colony stimulating factor
HES	hématoxyline-éosine-Safran
HSA	albumine humaine
Ig(s)	immunoglobuline(s)
IL-13	interleukine 13
IL-4	interleukine 4
IL-5	interleukine 5
IL-5Rα	sous unité alpha du récepteur à l'IL-5
IL-8	interleukine 8
IL-9	interleukine 9
IL-9Rα	sous unité alpha du récepteur à l'IL-9
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
MBP	eosinophil granule major basic protein
MMPs	métalloprotéases matricielles
PAMPs	motifs moléculaires associés aux pathogènes
PAR	protease activated receptor
PBS	phosphate-buffered saline
PNS	polypose naso-sinusienne
PRR	pattern recognition receptor
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
SA	staphylocoque aureus
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
T reg	lymphocyte T régulateur
TDM	tomodensitométrie
TGF-β	tumoral growth factor beta
Th2	T-helper type 2
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteases
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
VLA-4	very late antigen-4

INTRODUCTION

I. DIAGNOSTIC DE LA POLYPOSE NASO-SINUSIENNE

La polypose naso-sinusienne (PNS) est une maladie inflammatoire chronique des cavités naso-sinusiennes. Elle touche 1 à 4,3 % de la population générale (1)(2)(3). Elle serait plus fréquente chez l'homme entre 50 et 59 ans (4).

Le diagnostic de PNS est défini selon les critères édictés par l'EPOS 2012 (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps). Le patient doit présenter au moins 2 symptômes rhino-sinusiens (dont l'obstruction nasale ou la rhinorrhée) évoluant depuis plus de 12 semaines. Doivent s'y associer la présence de tuméfactions inflammatoires (polypes) dans chacune des fosses nasales en endoscopie (Figure 1) et la présence d'opacités naso-sinusiennes diffuses en tomodensitométrie (TDM) (Figure 2) (4).

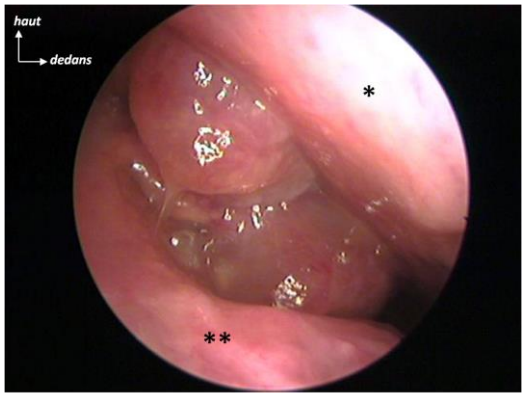


Figure 1: Aspect endoscopique des polypes dans une fosse nasale droite.
Des tuméfactions jaunâtres et translucides occupent la fosse nasale droite entre la cloison (*) et le cornet inférieur droit (**).

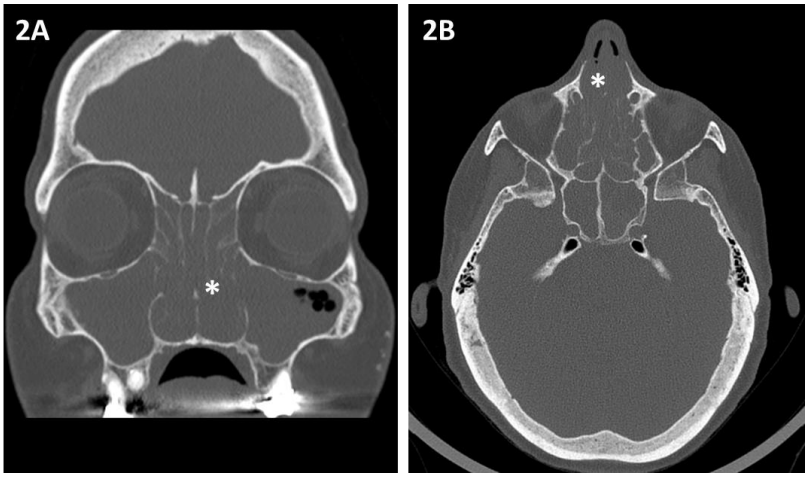


Figure 2: Aspect tomodensitométrique de la PNS.
Des opacités des fosses nasales (*) et des différents sinus sont observées de manière diffuse et symétrique sur la coupe coronale (2A) et la coupe axiale (2B).

Des classifications ont été proposées pour quantifier l'importance de la pathologie muqueuse: le score de Lildholdt (5) permettant de mesurer en endoscopie la taille des polypes par rapport à la position des cornets moyen et inférieur (Figure 3), le score de Lund-Mackay permettant de grader en TDM la topographie et le nombre des opacités sinusiennes (Tableau 1) (6).

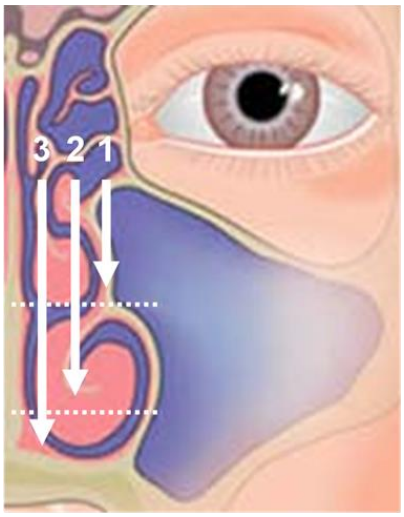


Figure 3: Score de taille des polypes selon Lildholdt.
La taille des polypes est déterminée selon la position du bord inférieur du polype le plus déclive par rapport aux reliefs turbinaux (stade 1 = ne dépasse pas le méat moyen, stade 2 = dépasse le méat moyen sans atteindre le bord inférieur du cornet inférieur, stade 3 = dépasse le bord inférieur du cornet inférieur). Un score moyen sur 3 est établi pour les 2 fosses nasales.

Tableau 1: Score tomodensitométrique de Lund-Mackay.

Sinus	droit	gauche
Maxillaire (0, 1, 2)		
Ethmoïde antérieur (0, 1, 2)		
Ethmoïde postérieur (0, 1, 2)		
Frontal (0, 1, 2)		
Sphénoïde (0, 1, 2)		
Méat moyen (0, 2)*		
Total	/12	/12

Les opacités naso-sinusiennes sont cotées de 0 à 2 pour chaque fosse nasale (0 = pas d'opacité, 1 = opacité partielle, 2 = opacité complète). Un score total de 0 à 24 est établi pour les 2 fosses nasales.
* pour le méat moyen (0 = méat libre, 2 = méat obturé).

La PNS est associée à un asthme ou à une hyperréactivité bronchique dans 31 à 42% des cas (3). Le diagnostic est basé sur les épreuves fonctionnelles respiratoires et le test de provocation à la métacholine. Une intolérance à l'aspirine est observée dans 15% des cas (7).

Le diagnostic est habituellement établi par l'interrogatoire. L'association de la PNS, de l'asthme et de l'intolérance à l'aspirine constitue la triade du syndrome de Widal ou Samter.

L'impact fonctionnel de la PNS est majeur et peut altérer de manière significative la qualité de vie des patients sur le plan social et professionnel (8). Cette pathologie représente 18 à 22 millions de consultations par an aux Etats-Unis (9) avec une consommation de soins estimée à 2,4 milliards de dollars (10). Les conséquences socioéconomiques sont aussi significatives avec une perte de productivité et un absentéisme professionnel (11).

II. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA POLYPOSE NASO-SINUSIENNE

Les mécanismes étio-pathogéniques à l'origine de la PNS font l'objet de nombreux travaux de recherche à la fois sur le plan clinique, microbiologique et immunitaire. Ces études le plus souvent réalisées chez l'adulte permettent de souligner l'extrême complexité des voies de signalisations impliquées et l'intrication des facteurs causaux potentiels.

II.A. Rôle des comorbidités

Sur le plan clinique, l'asthme, l'allergie et l'intolérance à l'aspirine ont souvent été incriminés dans la genèse de la PNS. Les travaux épidémiologiques publiés montrent que ces morbidités apparaissent davantage comme des cofacteurs aggravant l'inflammation proprement liée à la PNS et non pas comme des facteurs déclenchants.

Bien que l'asthme et la PNS soient fréquemment associés, la relation de causalité existant entre ces 2 pathologies est encore mal connue (12). Les atteintes bronchique et sinusienne peuvent ainsi se développer simultanément ou la PNS peut précéder l'apparition de l'asthme (13).

Le rôle de l'allergie est controversé. La prévalence de la PNS chez les patients atteints de rhinite allergique est de 0,5 à 4,5%, ce qui est comparable à la prévalence de la PNS observée dans la population générale (3)(4). Une étude de Bachert *et al.* montrait que l'importance de l'infiltration inflammatoire de la muqueuse nasale au cours de la PNS n'était pas liée à la coexistence d'une sensibilisation aux tests cutanés allergiques (14).

L'intolérance à l'aspirine et plus généralement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) est associée à la PNS dans 36 à 96 % des cas (7). Sur le plan métabolique, il s'agit d'une déviation de la voie de dégradation de l'acide arachidonique vers la voie de la lipo-oxygénase et des leucotriènes aux dépens de la voie de la cyclo-oxygénase. En résultent une diminution de la production des prostaglandines et une diminution de leur action inhibitrice sur le chimiotactisme et l'activation des éosinophiles tissulaires (15). La présence d'une intolérance à l'aspirine s'associe souvent à un état inflammatoire tissulaire plus sévère, aggravant l'inflammation proprement liée à la PNS par des voies métaboliques distinctes (4).

II.B. Rôle des facteurs environnementaux

Sur le plan anatomique, les cavités naso-sinusiennes constituent le premier filtre de l'arbre respiratoire face aux agents aggressifs de l'environnement. L'exposition aux toxines (tabac, ozone, dioxyde de sulfure, particules de diesel) est susceptible d'induire un stress oxydatif et nitrosatif à l'origine de lésions tissulaires inflammatoires altérant la barrière épithéliale (16)(17). Le rôle de ces expositions dans le développement de la PNS n'est pourtant pas clair. Il n'a pas été montré de différence de prévalence de la PNS selon le mode de vie ou l'exposition professionnelle à des agents irritants (18). L'impact du tabagisme et de la pollution n'est pas non plus établi (3)(18).

II.C. Rôle des agents infectieux

L'agression de l'épithélium nasal par les agents microbiens est proposée dans de nombreuses études récentes comme un facteur étio-pathogènique majeur de la PNS. L'altération des interactions hôte-environnement au niveau naso-sinusien mettrait en jeu à la fois les mécanismes de l'immunité innée et de l'immunité acquise dans le déclenchement et l'entretien de la boucle inflammatoire tissulaire.

II.C.1. Les agents fongiques

Le rôle des agents fongiques est controversé dans la mesure où leur présence est ubiquitaire comme le soulignent des études comparant des sujets contrôles et des sujets

atteints de rhinosinusites chroniques (19). Cependant leur participation ne peut être éliminée. Ainsi *Alternaria* contient des protéases pouvant de manière non spécifique activer les récepteurs PAR (Protease-Activated Receptor) présents au pôle apical des cellules épithéliales nasales. Ces récepteurs sont impliqués dans l'activation des granulocytes (20). De plus la paroi cellulaire des agents fongiques contient la chitine, un polysaccharide azoté reconnu par les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) des cellules épithéliales nasales. Cette interaction induit une activation des voies de l'immunité innée (21). Le manque d'études convaincantes sur le rôle immunostimulant des agents fongiques et l'inefficacité de l'amphotéricine B dans les essais cliniques sur les rhinosinusites chroniques (22) ne permettent pas à l'heure actuelle de retenir cette hypothèse étiologique fongique dans la génèse de la PNS.

II.C.2. Les virus

L'implication des virus respiratoires est établie dans les rhinosinusites aigües. La mise en jeu des voies immunitaires innée et acquise provoque une inflammation sinusienne transitoire (23). Bien que le génome viral puisse être intégré dans l'ADN de la cellule hôte au niveau des voies respiratoires et induire théoriquement une infection latente, les études comparant la présence de virus dans les cellules épithéliales de patients atteints de rhinosinusites chroniques et de patients contrôles n'ont pas montré de différence significative (24). Le rôle des infections virales durant l'enfance dans l'apparition d'un asthme et le rôle des infections virales dans les exacerbations d'asthme ont pu en revanche être établi (25)(26). Cet aspect n'a pas été étudié dans la PNS. Le manque d'études sur les relations entre virus et rhinosinusite chronique ne permet pas de conclure.

II.C.3. Les agents bactériens

Bien que largement documenté, le rôle des agents bactériens dans l'installation de la rhinosinusite chronique, et plus particulièrement de la PNS, reste débattu. La flore bactérienne commensale des cavités naso-sinusiennes pourrait avoir un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (27). Le microbiote nasal est composé de multiples espèces bactériennes.Le staphylocoque et le corynebacterium en sont les espèces

dominantes (28). Les études comparant la flore naso-sinusienne de patients atteints de rhinosinusites chroniques et de patients contrôles retrouvent des compositions bactériennes très variées et parfois semblables (29)(30). La variabilité des techniques de prélèvements, des méthodes d'analyse (classique ou génomique), la présence de bactéries intra-épithéliales et de biofilms sinusiens rendent l'interprétation de ces résultats difficile. *Staphylococcus Aureus (SA)* est l'agent pathogène le plus fréquemment décrit comme associé à la rhinosinusite chronique dans les pays occidentaux (31). De nombreux travaux publiés ces 10 dernières années portant sur l'implication du *SA* dans la PNS ont permis de préciser les interactions de ce pathogène avec les différents acteurs immunitaires à l'origine de l'inflammation chronique et de la formation des polypes. La présence du *SA* a ainsi été démontrée chez les patients atteints de PNS à la fois sur cultures (32) et au sein de l'épithélium nasal par comparaison à des sujets contrôles (33). Les toxines produites par le *SA* se comporteraient comme des super-antigènes amplifiant la réponse inflammatoire lymphocytaire T-helper 2 dépendante (Th2) à l'origine du recrutement et de l'activation des polynucléaires éosinophiles (EOs) (34). La toxine SpA du staphylocoque stimulerait aussi la dégranulation mastocytaire (35). D'autres études comparables sur le plan méthodologique ont été menées sur des populations asiatiques atteintes de PNS. Elles montraient que le *SA* était moins fréquemment retrouvé au sein de la muqueuse nasale de ces patients soulignant la probable intrication des facteurs à l'origine de la PNS (36).

II.D. Mise en jeu des mécanismes de l'immunité innée et acquise (ou adaptative)

En parallèle de l'action immunostimulante des antigènes staphylococciques précédemment évoquée, les différents groupes cellulaires présents au sein de la muqueuse nasale participent également à l'inflammation locale (Tableau 2).

II.D.1. Rôle de l'épithélium nasal

Les cellules épithéliales nasales joueraient un rôle actif dans le déclenchement et l'entretien de cette inflammation. La stimulation des récepteurs PRR au pôle apical des cellules épithéliales nasales par les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) présents sur les bactéries ou les parasites induit la libération de facteurs d'adhérence pour

les neutrophiles et la libération de chemokines pro-inflammatoires (37). L'activation des récepteurs PAR par les protéases bactériennes ou fongiques aboutit également à la production de molécules antimicrobiennes à type d'enzymes (lysozymes, peroxydases), d'opsonines (complément) ou de protéines perméabilisantes (défensines) (38) et à la libération de cytokines pro-inflammatoires (39).

Certaines de ces cytokines sont impliquées dans le recrutement et la survie des EO (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), eotaxines) (40)(41), dans la polarisation des cellules dendritiques (thymic stromal lymphopoietin (TSLP)) (42), et dans la prolifération et la commutation isotypique des lymphocytes B (B-cell activating factor (BAFF)) (43). De nombreuses études ont montré la surexpression de ces cytokines au cours de la PNS (40)(44)(45). Leur surexpression souligne également l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil lymphocytaire Th2 dans la population caucasienne.

II.D.2. Rôle des acteurs de l'immunité innée

Plusieurs travaux ont permis d'évoquer l'implication des différents acteurs de l'immunité innée au cours de la PNS.

II.D.2.a. Les macrophages

La présence de macrophages de type M2 a été démontrée au niveau des polypes (46). Ces cellules, dont le recrutement par les EOs a été analysé au cours de la PNS (47), permettent d'établir un lien entre les voies de l'immunité innée et acquise. Les macrophages M2 participent ainsi à l'élimination des pathogènes et coordonnent la réponse immunitaire acquise en produisant notamment des facteurs chimiotactiques pour les lymphocytes T naïfs, les cellules dendritiques et les EOs (48).

II.D.2.b. Les mastocytes

Une activation des mastocytes au cours de la PNS selon plusieurs modes a été observée: par la voie classique de l'immunité innée via les récepteurs PRR (49) et par une stimulation directe via la protéine SpA du *SA* (35). En plus de libérer les composants issus de granules préformés (histamine, sérines protéases) impliqués dans le remodelage tissulaire

(4), les mastocytes activés libèrent également des cytokines pro-inflammatoires. Ils participent ainsi au recrutement des EOs (50) et à l'activation des lymphocytes Th2 (51).

II.D.2.c. Les neutrophiles

L'implication des neutrophiles au cours de la PNS est peu précise. Alors que l'interleukine 8 (IL-8), principal agent de recrutement des neutrophiles, est augmentée dans la PNS (52), ces cellules restent en quantité relativement plus faible par rapport aux EOs dans les populations caucasiennes atteintes de PNS. A côté de leur rôle classique de phagocytose précoce des pathogènes extracellulaires, ces cellules pourraient être impliquées dans le remodelage tissulaire (53).

II.D.3. Rôle des acteurs de l'immunité acquise (ou adaptative)

II.D.3.a. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques dont la présence dans les polypes a été affirmée (54) permettent, à l'image des macrophages M2, d'établir un lien entre les voies de l'immunité innée et acquise. Ils interagissent avec l'épithélium nasal via TSLP (42)(45) et présentent les antigènes aux lymphocytes immatures sous muqueux orientant la réponse immunitaire vers un profil Th2 (4).

II.D.3.b. Les lymphocytes B et les plasmocytes

La sécrétion des immunoglobulines (Igs) par les lymphocytes B jouerait un rôle important dans la réaction inflammatoire au cours de la PNS. L'implication de ces cellules après stimulation épithéliale a été démontrée par la mise en évidence d'une corrélation des taux de BAFF avec le nombre de lymphocytes B au sein des polypes (43). La production des IgA par un mécanisme T indépendant permet de limiter la colonisation microbiologique muqueuse (55). Les IgD présentes également au niveau muqueux interviennent via les polynucléaires basophiles dans la défense contre les bactéries respiratoires (4). Dans un environnement cytokinique Th2, la commutation isotypique IgE durant la différenciation plasmocytaire constituerait aussi une caractéristique majeure de l'inflammation au cours de la PNS (56)(57). La production d'IgE indépendante du statut atopique des patients PNS et la production d'IgA ont pu être démontrées comme intervenant dans la dégranulation des EOs

et des mastocytes (57)(58). L'augmentation de la réponse B lymphocytaire est également suggérée par la présence de centres germinatifs pseudo-folliculaires au sein des polypes (59).

II.D.3.c. Les lymphocytes T

L'équilibre relatif des différentes populations lymphocytaires T CD4+ constitue un point essentiel de l'homéostasie tissulaire. La modification de cet équilibre, sous l'influence des agents pathogènes, des acteurs de l'immunité innée, de l'épithélium nasal et des cellules dendritiques, au profit de certaines sous-populations lymphocytaires, concourt au développement de la réponse inflammatoire. En fonction de la sous-population prédominante, des profils immunitaires se dessinent caractérisant pour certains des états pathologiques. Des travaux récents sur la PNS menés dans la population caucasienne et la population asiatique ont montré un déficit relatif en lymphocytes T régulateurs (T reg) (60). Ce déficit serait induit par une diminution d'expression du facteur de transcription FOXP3 (Forkhead box P3) et ce quel que soit le statut allergique des patients PNS (61). Il en résulterait une augmentation du nombre de lymphocytes Th2 dans la population caucasienne au sein d'un environnement cytokinique pro Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) riche en EOs (62). Le profil inflammatoire chez les patients asiatiques PNS est quant à lui caractérisé par une représentation accrue des lymphocytes Th17 dans un environnement relativement plus riche en neutrophiles (60)(63). La migration tissulaire de cellules lymphoïdes innées répondant à des signaux de domiciliation épithéliale serait aussi impliquée dans la modification de cette balance lymphocytaire en produisant notamment des cytokines Th2 (IL-13) influençant la polarisation dendritique et le recrutement des EOs (64)(65).

II.D.4. Rôle de l'éosinophile

Les EOs sont des granulocytes circulants impliqués sur le plan muqueux dans la défense immunitaire anti-parasitaire par dégranulation de médiateurs toxiques à action enzymatique. Leur présence en grande quantité au cours des pathologies inflammatoires respiratoires chroniques (asthme, rhinite allergique) font de l'EO un pivot de la réponse inflammatoire tissulaire. Dans le cadre des rhinosinusites chroniques, l'éosinophilie sanguine et tissulaire constitue un marqueur biologique de la PNS dans la population caucasienne (4).

Comme souligné dans l'évocation des mécanismes de l'immunité innée et adaptative, le recrutement, la prolifération et l'activation des EOs sont au centre de la plupart des hypothèses physiopathologiques tentant d'expliquer la PNS. Les EOs sont décrits par les partisans de la théorie fongique comme le principal acteur dans le développement des rhinosinusites chroniques (19)(20). L'hypothèse bactérienne précisant le rôle super-antigénique des toxines du *SA* décrit aussi l'EO comme la cible principale de la production polyclonale d'IgE à l'origine de sa dégranulation (14)(32)(34). L'épithélium nasal concourt aussi en situation inflammatoire au recrutement des EOs (40)(41). Enfin la présence d'IgA, l'environnement cytokinique (IL-4, IL-5, IL-13) et le profil lymphocytaire Th2 observés au cours de la PNS favorisent la survie et l'activation des EOs (61)(64).

Une fois recruté et activé, l'EO participe au développement et à l'entretien de la réaction inflammatoire au cours de la PNS. La libération par dégranulation de médiateurs toxiques (MBP (eosinophil granule major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein), EDN (eosinophil-derived neurotoxin), EPO (eosinophil peroxidase)) entraine des lésions de l'épithélium nasal et de la matrice extracellulaire à l'origine du remodelage tissulaire (66). Les EOs produisent aussi des signaux favorisant la mobilisation des autres acteurs de la réponse immunitaire. La libération de CCL23 (CC chemokine ligand 23) par les EOs présents au sein des polypes permet le recrutement des macrophages (47). La production d'IL-5 par les EOs au cours de la PNS permet d'auto-entretenir la boucle d'activation des EOs et concourt à l'environnement cytokinique pro Th2 favorisant la production d'IgE par les plasmocytes (67).

II.D.5. Le remodelage tissulaire

Les processus de remodelage font référence à l'ensemble des modifications de la composition cellulaire et de la structuration tissulaire au cours de situations de stress telle que la rhinosinusite chronique (4). Ces processus sont à l'origine de la formation des polypes dans la PNS. Outre l'infiltration granulocytaire et lymphocytaire du stroma inhérente à la réaction inflammatoire (59), le polype se caractérise par des modifications de l'épithélium (hyperplasie, érosion, métaplasie), de la membrane basale (épaississement) et de la matrice extracellulaire (œdème, fibrose) (68)(69)(70). La dégranulation de protéines toxiques par les EOs et les mastocytes est en partie à l'origine des lésions tissulaires observées au cours de la

PNS (66). Le niveau d'expression de la TGF-β (Tumoral growth factor beta), facteur profibrotique impliqué dans la structuration de la matrice extracellulaire, a été décrit comme diminué dans la PNS (71), favorisant ainsi la déposition d'albumine dans le polype (72). Un déséquilibre d'activité des métalloprotéases matricielles (MMPs) et de leurs inhibiteurs (TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteases)) contrôlé par le TGF-β serait aussi à l'origine de l'œdème. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une expression différente de ces enzymes entre le polype et des tissus contrôles (73). L'IL-8 et l'IL-13 surexprimées dans la PNS participent également au remodelage en favorisant la production de mucus et l'hyperplasie des glandes sous muqueuses (74).

II.E. Rôle des facteurs génétiques

Bien que la notion d'antécédent familial de PNS (de 14 à 58%) ait été décrit dans la littérature (75), aucune étude statistique de marqueurs chromosomiques ou de gène candidat n'a été publiée à ce jour sur la PNS. Des travaux ont néanmoins pu montrer une association avec certains génotypes. Une augmentation du génotype HLA-DR7 chez les patients atteints du syndrome de Widal a ainsi été mise en évidence (76), de même qu'une augmentation du génotype HLA-A74 chez les patient souffrant de PNS isolée (77).

Une modulation de l'expression de certains gènes a été observée au sein de la muqueuse nasale de patients atteints de PNS ou de rhinite chronique. Sur une analyse de 12000 gènes, Fritz *et al.* observaient une expression différentielle de 34 gènes. Chez les patients atteints de PNS, étaient observées une augmentation de l'expression de gènes liés à l'inflammation et à la tumorogénèse et une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et de la morphologie cellulaires (78).

L'ensemble des données fournies par la littérature permet d'établir un modèle physiopathologique de la PNS au cours duquel tous les acteurs de la réponse immunitaire innée et adaptative participent à l'amplification ou à l'entretien de la réaction inflammatoire muqueuse et au remodelage tissulaire (Figure 4). Néanmoins, en dépit des nombreuses connaissances acquises, la prise en charge thérapeutique de la PNS reste encore limitée à l'heure actuelle à une approche symptomatique.

Tableau 2: Voies de signalisation inflammatoire dans la PNS.

Ag: antigène, CL innées: cellules lymphoïdes innées, DC : cellule dendritique, LyT: lymphocyte T, LyB: lymphocyte B.
* profil lymphocytaire de la PNS différent selon l'origine géographique.

Acteurs	Régulateurs/stimulus	Médiateurs produits	Cibles et/ou effets
Epithélium nasal	PRR/pathogènes (37) PAR/protéases bactériennes (37)	TSLP (42) IL-33(64) BAFF(43)	Polarisation DC et LyT CD4+ Recrutement CL Innées Activation LyB
		Lysozymes, peroxydases, opsonines, défensines (38)(39)	Remodelage tissulaire
		RANTES, eotaxines 1-3 (40)(41)	Recrutement EOs
Macrophages M2	CCL23(47) Pathogènes	CCL11, eotaxine 3 (47) CCL18 (48)	Recrutement EOs Adhérence DC et LyT CD4+
			Phagocytose
Mastocytes	PRR (49) Protéine SpA (35)	Histamine Sérines protéases (4)	Remodelage tissulaire
		IL-5 (50)	Recrutement EOs
		IL-4, IL-13 Prostaglandine D2 (51)	Activation LyTh2
Neutrophiles	IL-8 (52)	Neutrophile élastase (53)	Remodelage tissulaire
		Défensines Myéloperoxydase (52)	Phagocytose précoce
DC	TSLP (42)(45)	Présentation antigénique	Polarisation Th2 LyT CD4+ (4)
LyB	BAFF (43) SuperAg staphylococcique (34)	IgA (55)	Action antimicrobienne
		IgD (4)	Activation Basophiles
		IgE (56)(57)(58)	Dégranulation EOs et Mastocytes
LyT	↓FoxP3(61)	Déficit LyTreg (60)	Entretien de l'inflammation
	IL-4, IL-5, IL-13 (62)	Ly Th2 (Caucasien)*	Recrutement EOs
	IL-17, IFNγ (60)(102)	Ly Th17 (Asiatique)*	Recrutements Neutrophiles
	IL-13(64)(65)	CL innées	Polarisation Th2 DC Recrutement EOs
EO	Super Ag staphylococcique (14)(32)(34) IgE, IgA IL-4, IL-5, IL-13	EPO, EDN, MBP, ECP (66)	Remodelage tissulaire
		CCL23 (47)	Recrutement Neutrophiles et Macrophages
		IL-5 (67)	Autoactivation EOs Production IgE par LyB

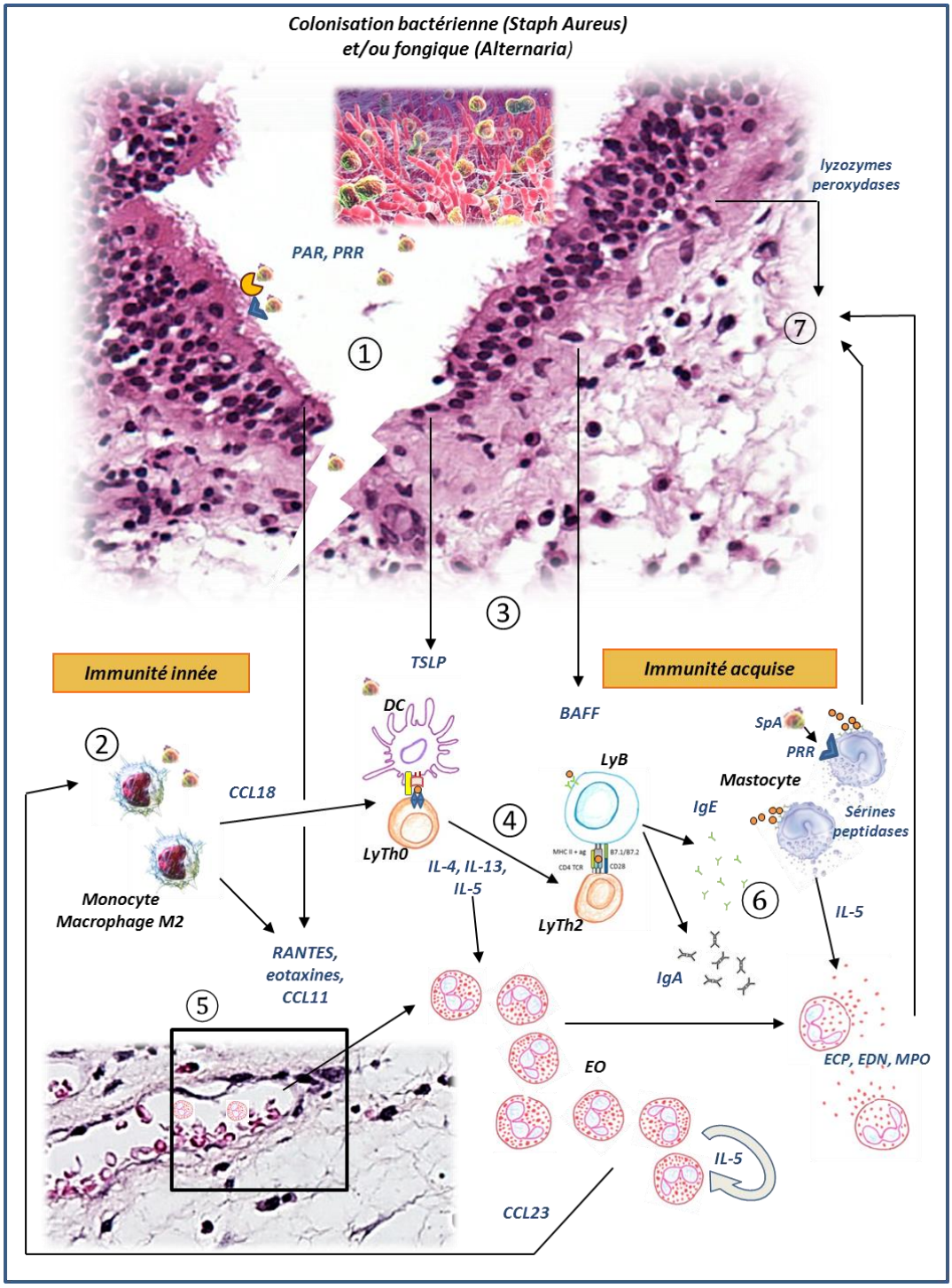


Figure 4 : Interactions des différents partenaires de la réponse immunitaire innée et acquise dans l'inflammation observée au cours de la PNS.

L'agression de la muqueuse nasale par les agents infectieux favorise l'activation des cellules épithéliales ① et la mise en jeu de la phagocytose macrophagique ②. L'épithélium recrute et active les cellules dendritiques et les lymphocytes B ③. La libération de cytokines Th2 oriente la réaction immunitaire ④ avec une production polyclonale d'igE et d'igA ⑥. La production de facteurs d'adhérence par les macrophages M2 et par l'épithélium permet le recrutement des EOs depuis le flux sanguin (les EOs s'autoactivent par production d'IL-5) ⑤. L'interaction antigène staphylococcique/anticorps favorise la dégranulation des EOs et des mastocytes (le mastocyte est lui-même directement stimulé par les agents bactériens via PRR) ⑥. La libération de peptidases et de protéines cytotoxiques participe au remodelage tissulaire (l'épithélium intervient aussi dans son propre remodelage par la production de protéases) ⑦.

III. LIMITES THÉRAPEUTIQUES DE LA POLYPOSE NASO-SINUSIENNE

III.A. Traitement à visée symptomatique

III.A.1. La corticothérapie

La prise en charge de la PNS s'appuie en première intention sur le traitement médical à visée anti-inflammatoire.

La corticothérapie topique en gouttes, en pulvérisation ou en aérosol constitue le traitement de fond de la PNS. Les protocoles thérapeutiques sont variables en fonction des équipes et les spécialités pharmaceutiques sont nombreuses. Une méta-analyse menée en 2012 sur 873 publications portant sur l'usage des corticoïdes topiques permettait de sélectionner 38 essais randomisés incluant au total 3532 patients (4). Parmi ces 38 études, 34 comparaient la corticothérapie topique à un placebo. Le regroupement des données de ces 34 études montraient un bénéfice de la corticothérapie topique vis-à-vis du placebo en termes d'amélioration des symptômes, de réduction de taille des polypes et d'amélioration du flux inspiratoire nasal. L'effet sur l'amélioration de la fonction olfactive recherché dans 22 études n'a pas été démontré. Une analyse en sous-groupes comparant le mode de délivrance du corticoïde topique ou les différents principes actifs ne montraient pas de différence globale du bénéfice. L'efficacité des traitements topiques sur la muqueuse naso-sinusienne est liée à son accessibilité rendue difficile par le volume des polypes.

La corticothérapie par voie systémique est proposée le plus souvent sous forme de cures répétées 3 à 4 fois par an, à la posologie de 1mg/Kg/jour équivalent prednisone, en complément de la corticothérapie topique. Plusieurs études randomisées comparant l'efficacité de la prednisone versus placebo sur des effectifs limités de patients montraient une réduction des symptômes et de la taille des polypes (79)(80). Les effets indésirables des corticoïdes par voie systémique au long cours sur le métabolisme du glucose, sur le métabolisme phospho-calcique, sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et sur le cristallin limitent en général la durée d'utilisation à 15 jours consécutifs. Le patient considéré comme corticorésistant en pratique clinique présente à plus ou moins court terme après arrêt de la corticothérapie générale une nouvelle aggravation des symptômes.

III. A.2. La chirurgie

La prise en charge chirurgicale de la PNS est proposée après échec d'un traitement médical maximal. Le traitement médical est considéré comme inefficace, et le patient corticorésistant, lorsque la gêne fonctionnelle persistante est jugée invalidante par le patient après une corticothérapie topique continue dont l'observance a été vérifiée et une corticothérapie par voie systémique en cures courtes répétées consécutivement 3 à 4 fois sur 9 à 12 mois. Dans ce contexte, les buts de la chirurgie sont de désobstruer les fosses nasales, d'améliorer le drainage muco-ciliaire en levant les obstacles ostio-méataux, de rétablir une ventilation sinusienne et de permettre une meilleure diffusion locale de la corticothérapie topique sur une plus large cavité (Figure 5) (4).



Figure 5: Aspect postopératoire à 1 an d'une fosse nasale droite après ethmoïdectomie endoscopique.
On observe une cavité large avec ouverture des cellules ethmoïdales (*) rendues accessibles à la corticothérapie topique.

Selon l'étendue de la résection muqueuse, plusieurs techniques chirurgicales sont proposées: la polypectomie, l'ethmoïdectomie fonctionnelle ou l'ethmoïdectomie radicale appelée aussi nasalisation. Une étude menée par Jankowski *et al.* sur 76 patients comparant la nasalisation et l'ethmoïdectomie fonctionnelle retrouvait un meilleur résultat sur le long terme avec la nasalisation (81). Coste *et al.* retrouvaient un bénéfice de la polypectomie comparable à celui l'ethmoïdectomie radicale sur une série de 127 patients (82). L'efficacité relative de ces techniques est difficile à établir. Les études portant sur l'évaluation des stratégies thérapeutiques chirurgicales sont hétérogènes incluant des populations très

diverses en termes de sévérité clinique de la PNS. L'importance de l'ouverture sinusienne et de la résection muqueuse peut aussi être très variable d'une équipe à l'autre pour une même approche chirurgicale notamment lorsque l'ethmoïdectomie est dite fonctionnelle. Enfin les protocoles post-opératoires de traitement médical sont multiples; la qualité du suivi et des résultats étant inévitablement influencée par la compliance du patient à ces traitements.

L'efficacité de la chirurgie sur l'amélioration des symptômes de la PNS, quel que soit la technique, a été affirmée dans de nombreuses études. Une revue menée par Dalziel *et al.* portant sur 33 publications évaluant la chirurgie endoscopique des sinus retrouvait une amélioration des symptômes dans 78 à 88% des cas (83). La chirurgie permet en particulier de réduire l'obstruction nasale avec un impact global positif sur la qualité de vie du patient notamment sur le plan social et professionnel (8). L'efficacité relative de la chirurgie par rapport au traitement médical est difficile à établir dans la mesure où la chirurgie est prioritairement indiquée en cas de PNS réfractaire au traitement par corticothérapie topique et systémique.

Bien qu'efficace, la chirurgie ne permet pas de prémunir les patients d'une récidive fonctionnellement invalidante de la PNS en relation avec une repousse significative des polypes. Une étude multicentrique incluant 3128 patients traités chirurgicalement décrivait un taux de récidive de la PNS nécessitant une reprise chirurgicale de 11,8% à 36 mois (84). La chirurgie expose aussi à des complications pouvant être considérées comme sévères pour une prise en charge à visée fonctionnelle. L'étude précédemment citée rapportait un taux d'épistaxis sévère de 5% et un taux de complications intra-orbitaires et cérébro-méningées de 0,8%. Les conditions d'intervention sous endoscope sont souvent rendues difficiles par la résection d'une muqueuse inflammatoire et très hémorragique, altérant le repérage des bornes anatomiques, dans un champ opératoire étroit (85). La description de ces complications exceptionnelles fait partie dans le cadre d'une information loyale de la stratégie thérapeutique à établir avec le patient.

III.B. Traitement à visée étiologique

Sur la base des hypothèses étio-pathogéniques développées au travers des publications, plusieurs options thérapeutiques ont fait l'objet d'évaluation dans la PNS.

III.B.1. Les antimycotiques

L'impact réel des agents fongiques sur la physiopathologie de la PNS est, comme évoqué précédemment, difficile à établir. Une revue d'Ebbens *et al.* sur l'utilisation topique de l'amphotéricine B en pulvérisation ou en lavage de fosse nasale ne montrait pas de bénéfice de ce traitement (86). L'utilisation des antifongiques en application locale ou par voie systémique au long cours n'est pas recommandée dans la PNS (4).

III.B.2. Les antibiotiques

S'appuyant sur les travaux attribuant un rôle immunostimulant aux toxines produites par le *SA*, l'efficacité sur la PNS des antibiotiques administrés par voie générale a été évaluée en cure courte et en cure prolongée. Dans un essai randomisé comparant la doxycycline administrée *per os* pendant 20 jours au placebo, van Zele *et al.* montraient une diminution significative mais modérée de la taille des polypes et des rhinorrées sur 12 semaines de suivi. Les autres symptômes étaient inchangés (87). L'analyse des sécrétions nasales des patients du groupe traité révélait par ailleurs une diminution des concentrations en ECP et MPO par rapport au groupe placebo après traitement. Une étude randomisée versus placebo de Schalek *et al.* ne retrouvait pas d'effet significatif d'une antibiothérapie *per os* anti-staphylococcique administrée 3 semaines (88). Peu d'études portant strictement sur la PNS ont analysé l'effet d'une antibiothérapie prolongée. Un essai non contrôlé évaluant l'effet de la clarythromycine *per os* 3 mois ne retrouvait une diminution de taille des polypes que chez les patients ayant un taux d'IL-8 initialement élevé dans les sécrétions nasales (89).

III.B.3. Les antihistaminiques

Les mastocytes participant aux mécanismes inflammatoires dans la PNS, l'efficacité des antihistaminiques a été testée. Un essai randomisé contrôlé de Haye et *al.* incluant 45 patients avec une PNS comparait l'effet de la cetirizine à un placebo sur une période de traitement de 3 mois. L'action de l'antihistaminique sur la taille des polypes et les symptômes rhinorrhéiques n'était pas significativement différente du placebo (90).

III.B.4. Les antileucotriènes

L'intérêt de ce traitement a été évalué dans plusieurs essais contrôlés sur des effectifs limités de patients présentant pour certains un asthme associé. Les résultats étaient partagés. Une étude randomisée versus placebo incluant 24 patients avec une PNS et un asthme retrouvait une amélioration des scores symptomatiques et de taille des polypes après traitement par montélukast pendant 6 semaines (91). Une autre étude randomisée contrôlée incluant 20 patients ne montrait pas de bénéfice global après 8 semaines de traitement par montélukast vis-à-vis du placebo en complément d'un traitement topique corticoïde (92).

III.B.5. Ciblage de la voie de l'immunité adaptative

III.B.5.a. Anti-IgE

L'omalizumab, anticorps monoclonal recombinant dirigé contre les IgE humaines, fait partie du traitement de fond des asthmes allergiques modérés à sévères. Les travaux sur la PNS ont mis en évidence des taux élevés d'IgE (14)(56) à la fois au niveau muqueux mais aussi au niveau sérique en association avec l'asthme (93). Une étude randomisée en double aveugle versus placebo incluant 14 patients avec une PNS résistante aux traitements corticoïdes et présentant un taux élevé d'IgE sérique n'a pas identifié de bénéfice de l'omalizumab en injection mensuelle pendant 6 mois sur le score tomodensitométrique d'opacités des sinus, sur le score endoscopique et sur le score symptomatique (94). Gevaert *et al.* dans un essai plus récent retrouvaient des résultats plus encourageants. Etaient inclus 24 patients avec une PNS associée à un asthme. L'omalizumab était administré à 16 patients tous les 15 jours ou tous les mois pendant 16 semaines selon le taux sérique d'IgE totales. Comparé au groupe placebo, les auteurs observaient dans le groupe traité une diminution significative de taille de polypes et des scores symptomatiques dès 8 semaines de traitement et ce quel que soit le statut allergique des patients. Le nombre limité de patients inclus, la sortie d'étude de 50% des patients placebo pour poussée inflammatoire sinusienne ou bronchique limitent l'impact de cet essai (95). Par ailleurs les conséquences au long cours de ce traitement immuno-modulateur restent à définir. Un patient de cette étude a développé

un lymphome lymphoblastique 1 an après la fin de l'essai sans qu'un lien de cause à effet n'ait pu être clairement établi.

III.B.5.b. Anti-IL-5

Comme pour les IgE, le rôle de l'IL-5 dans la réaction inflammatoire de la PNS a été démontré. L'IL-5 intervient dans le recrutement, la survie et l'activation des EOs tissulaires (67). La présence d'IL-5 sous différentes isoformes a été observée dans le sérum et la muqueuse de patients atteints de PNS (96). Le mepolizumab et le reslizumab sont 2 anticorps humanisés anti-IL-5 utilisés en injection intra-veineuse. Le mepolizumab est autorisé dans le traitement des syndromes hyper-éosinophiliques. Il est ainsi indiqué dans l'asthme sévère et permet de réduire les exacerbations respiratoires et l'hyper-éosinophilie (97). Le reslizumab est aussi utilisé dans le contrôle de l'asthme sévère (98). L'efficacité de ces 2 traitements a fait l'objet d'évaluations récentes dans la PNS associée à l'asthme. Un premier essai randomisé en double aveugle incluant 24 patients comparait le reslizumab en 1 injection au placebo. Le score de taille des polypes était amélioré à 12 semaines chez 50% des patients du groupe traité. Après 12 semaines, 4 patients du groupe traité présentaient une dégradation importante de ce score avec pour la plupart des patients un rebond du taux sanguin en EOs. Le recours à la corticothérapie était comparable entre le groupe traité et le groupe placebo. La réponse au traitement était corrélée à la concentration en IL-5 dans les sécrétions nasales avant randomisation (99). Un autre essai randomisé en double aveugle mené par la même équipe comparait l'effet du mepolizumab au placebo en 2 injections espacées d'un mois sur une période d'observation de 48 semaines chez 30 patients présentant une PNS associée à un asthme. Le bras traité présentait une diminution significative de la taille des polypes et du score tomodensitométrique après 8 semaines quel que soit le statut allergique des patients. Contrairement à l'étude précédente, les sujets répondeurs n'avaient pas dans les sécrétions nasales un taux initial d'IL-5 plus élevé. Ces résultats sont à mettre en balance avec le nombre limité de patients inclus et la sortie d'étude de 15 patients suite à une poussée inflammatoire nécessitant une corticothérapie ou un traitement chirurgical (100).

IV. LES ENJEUX DE LA POLYPOSE NASO-SINUSIENNE

Les éléments de physiopathologie apportés par la littérature soulignent bien la complexité des phénomènes dysimmunitaires conduisant à pérenniser les processus inflammatoires à l'origine de la PNS. L'hypothèse staphylococcique apparaît actuellement comme la piste la plus documentée mais l'efficacité partielle de l'antibiothérapie démontre bien la probable coexistence de plusieurs facteurs étiologiques. L'éosinophilie considérée comme un marqueur quasiment pathognomonique de la PNS dans la population caucasienne est moins prononcée dans d'autres régions géographiques. Le terme de « polypose naso-sinusienne » renvoie en réalité à un éventail de situations cliniques et inflammatoires beaucoup plus diverses et pour lesquelles le terme d'endotype ou phénotype a été introduit (101)(102).

Cette caractérisation phénotypique peut notamment s'appuyer sur des critères histologiques. La distinction entre rhinosinusite chronique sans polype et rhinosinusite chronique avec polypes a constitué l'un des premiers éléments de classification nosologique permettant de séparer les patients sur le plan clinique et de guider les options thérapeutiques (103). Au sein de la PNS, des classifications histologiques ont été proposées pour discerner les différents types de polypes sans établir de véritable lien avec les données cliniques (68)(69). Une meilleure description du polype sur le plan cellulaire et architectural en relation avec les comorbidités que sont notamment l'asthme, l'allergie et l'intolérance aux AINS pourrait constituer une première étape vers une meilleure caractérisation phénotypique des patients.

L'analyse phénotypique peut aussi s'appuyer sur le profil inflammatoire du polype en termes d'environnement cytokinique et de recrutement en effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire (101). Comme évoqué précédemment, la PNS dans la population caucasienne se caractérise le plus souvent (80%) par une infiltration cellulaire riche en EOs avec un profil immunitaire Th2 (104). Une étude incluant 70 patients d'origine européenne traités chirurgicalement pour une PNS montrait que la présence d'IL-5 et d'IgE dans les homogénats de polypes était fréquemment associée à une PNS riche en EOs (105). A l'inverse, plusieurs autres études analysant des populations asiatiques retrouvaient un profil plutôt neutrophilique avec une réponse immunitaire Th17 et une production d'interféron gamma (INFγ)(102)(106). Une mise en corrélation de ces phénotypes immuno-

inflammatoires avec les données cliniques a été proposée. Bachert *et al.* montraient ainsi que des taux élevés en IL-5 et IgE dans les polypes étaient associés à la présence d'un asthme (105). Une autre étude corrélait les taux d'expression des ARNm de RANTES et de l'éotaxine-2 dans les polypes avec la présence d'une intolérance aux AINS (41). Sun *et al.* montraient sur une série de 78 patients traités chirurgicalement pour une PNS qu'un taux élevé d'ECP dans les sécrétions nasales était associé à la présence d'un asthme ou d'une intolérance aux AINS (66).

L'identification de facteurs prédictifs de réponse au traitement médical ou de facteurs prédictifs de récidive après traitement chirurgical est aussi une perspective majeure dans la prise en charge de la PNS. Jusqu'à présent, les études se sont surtout intéressées aux données cliniques. L'importance de la pathologie muqueuse, représentée par la taille des polypes et l'intensité des opacités naso-sinusiennes en TDM, a ainsi été associée à la récidive dans plusieurs analyses rétrospectives (4)(107). Le risque d'un nouvel échec du traitement médical après chirurgie serait accru en cas de chirurgie de révision (108). L'asthme et l'intolérance aux AINS ont aussi été associés dans la littérature à la cortico-résistance des patients atteints de PNS et à la récidive après chirurgie (109)(110). L'allergie ne semble pas en revanche être un déterminant de l'échec thérapeutique (111). Le rôle du tabagisme est aussi difficile à établir. Alors que certains travaux évoquent un impact négatif du niveau de consommation de tabac sur le contrôle de la PNS (112), d'autres études n'établissent pas de lien entre le tabac et les résultats chirurgicaux (113).

Le rôle des marqueurs biologiques dans le contrôle médical et chirurgical de la PNS n'a pas été exploré dans la littérature. La mise en corrélation des profils phénotypiques immuno-inflammatoires avec l'efficacité des traitements pourrait permettre une meilleure sélection des options thérapeutiques.

OBJECTIFS

La définition de profils phénotypiques à la fois sur le plan tissulaire et biologique nous apparaît nécessaire pour identifier à l'avenir des facteurs pronostics fiables de réponse au traitement dans la PNS. Cette analyse phénotypique peut aussi se concevoir sur le plan protéomique par une caractérisation et une comparaison des profils d'expression protéique. Cette approche n'a jamais été utilisée dans la description de la PNS. L'intégration des co-morbidités dans le cadre de phénotypes, que l'on pourrait qualifier de « clinico-inflammatoires », est une étape importante dans la compréhension de la PNS et dans la définition de stratégies thérapeutiques ciblées.

L'EO est au cœur de la réaction inflammatoire dans la PNS dans notre population. Son recrutement et son activation au niveau tissulaire ont souvent été analysés par le biais d'approches globales d'identification de marqueurs sur broyat tissulaire (96)(114). La caractérisation immuno-phénotypique précise de l'EO au niveau du compartiment sanguin et du compartiment tissulaire, en corrélation avec les paramètres cliniques, nous apparaît essentielle. Cette analyse nécessite de pouvoir bénéficier d'une technique fiable de purification cellulaire au niveau tissulaire.

Le rôle de l'IL-5 dans l'activation et la survie de l'EO est au premier plan dans la PNS. Des études récentes sur l'asthme ont démontré que l'expression membranaire du récepteur à l'IL-5 sur les EOs bronchiques pouvait subir des modulations responsables d'une modification de la réponse inflammatoire (115)(116)(117). L'efficacité relative des traitements par anti-IgE et anti-IL5 sur des patients atteints de PNS associée à un asthme (91)(100) laisse supposer qu'un même mécanisme de modulation pourrait intervenir au niveau nasal.

L'IL-5 interagit avec d'autres cytokines à polarité Th2 dont la production, dépendante de sous- classes de cellules lymphocytaires, a surtout été étudiée dans l'asthme. L'IL-25 est une cytokine de découverte récente favorisant la production d'IL-5 et d'IgE au niveau tissulaire permettant la différenciation lymphocytaire Th2 (118). L'IL-33, produite par les cellules épithéliales, intervient dans la production d'IL-13 par les cellules lymphoïdes innées (64) et favorise ainsi le recrutement des EOs et la production d'IL-5. L'IL-9 a été identifiée dans une sous-population lymphocytaire régulatrice Th9. L'IL-9 est aussi produite par les lymphocytes Th2, les mastocytes et les EOs (119). Sur un modèle de souris transgénique

exprimant IL-9, Louahed *et al.* observaient une réponse inflammatoire Th2 exagérée avec une forte infiltration tissulaire en EOs en réponse à une stimulation antigénique péritonéale (120). Un lien a pu être établi dans l'asthme entre l'action de cette cytokine et les phénomènes inflammatoires observés au niveau de la muqueuse bronchique (121). L'IL9 serait impliquée dans la production de mucus dans les voies respiratoires (122). La concentration en IL-9 dans le produit de lavage broncho-alvéolaire serait corrélée à l'importance de l'hyper-réactivité bronchique et à l'infiltration alvéolaire en EOs (123). L'IL-9 participe ainsi à l'expression du récepteur à l'IL-5 (124) et agit de manière synergique avec l'IL-5 pour réduire l'apoptose des EOs dans l'asthme (125). Sur un autre modèle murin, il a aussi été montré que l'IL-9 est impliquée dans la commutation isotypique des lymphocytes B à l'origine de la production des IgE (126). Le récepteur de l'IL-9 possède une structure hétérodimérique apparentée à celle du récepteur à l'IL-5. Il a été demontré que le blocage spécifique de la sous unité α de ce récepteur inhibe la production d'agents chimiotactiques par les lymphocytes Th2 (127). Ce récepteur est aussi exprimé à la surface des éosinophiles sanguins. Ces caractéristiques font de cette cytokine un candidat potentiel dans la modulation de la réponse inflammatoire au cours de la PNS en association avec l'asthme. Alors que les rôles de l'IL-25 et de l'IL-33 commencent à être identifiés dans la PNS, celui de l'IL-9 n'a pas encore été exploré. Analyser l'implication de l'IL-9 dans la PNS nous semble une nouvelle piste de recherche à exploiter.

Les objectifs de notre étude sont :

- définir les profils phénotypiques tissulaires dans la PNS (objectif 1) par
    - L'établissement d'une classification histo-pathologique des polypes,
    - La caractérisation sur le plan architectural et cellulaire de ces polypes en corrélation avec les paramètres cliniques.
- définir les profils phénotypiques biologiques dans la PNS (objectif 2) par
    - L'analyse de l'expression des marqueurs de la réaction inflammatoire tissulaire en corrélation avec les paramètres cliniques,
    - La définition de l'immuno-phénotype membranaire des EOs au niveau tissulaire et au niveau sanguin après purification cellulaire,

  - L'identification d'une immunomodulation du récepteur à L'IL-5 sur l'EO en relation avec les paramètres cliniques,
  - L'exploration de cette immunomodulation en relation avec l'expression des cytokines à polarité Th2 : l'IL-5 et l'IL-9 dont le rôle n'est pas encore précisé.
- d'étendre la caractérisation phénotypique sur le plan protéomique, en proposant notamment d'établir, au sein des sécrétions nasales et du polype, un profil qualitatif et quantitatif d'expression protéique différentielle en relation avec le statut asthmatique du patient (objectif 3).

Les patients réfractaires à la corticothérapie locale et générale constituent la cible privilégiée des études visant à optimiser les traitements de la PNS. Nos investigations porteront exclusivement sur cette population. L'asthme apparaît comme une co-morbidité majeure dont l'impact sur la PNS doit être exploré. Les analyses comparatives évalueront systématiquement les patients selon ce statut asthmatique.

MATERIEL ET METHODES

L'ensemble des techniques utilisées est détaillé dans les 2 publications soumises à comité de lecture, intégrées dans la section résultats et correspondant aux objectifs 1 et 2. Ce chapitre abordera les caractéristiques générales de la population étudiée, les conditions de prélèvement tissulaire et les spécificités techniques liées à l'analyse des EOs.

I. POPULATION

L'ensemble des investigations était mené de manière prospective par recrutement monocentrique des patients présentant une PNS. Le diagnostic était posé selon les critères EPOS 2012 (4). Etaient inclus les patients âgés de plus de 18 ans en situation d'échec fonctionnel du traitement médical pour lesquels une indication opératoire de polypectomie ou d'ethmoïdectomie était retenue. Etait exclue toute autre forme de rhinosinusite chronique avec polypes pouvant être observée dans les pathologies muco-ciliaires, les déficits immunitaires ou les pathologies auto-immunes.

Un consentement éclairé et écrit des patients était obtenu avant toute analyse portant sur les polypes ou les sécrétions nasales. Les analyses immunophénotypiques sur les EOs sanguins et tissulaires étaient réalisées dans le cadre de l'étude SHE (syndrome d'hyperéosinophilie) validée par le comité d'éthique Nord Ouest (numéro d'enregistrement: 2009-A00314-53).

Les données cliniques recueillies en pré-opératoire étaient : âge, sexe, tabagisme, profession, antécédent de chirurgie naso-sinusienne. La présence d'un asthme ou d'une hyper-réactivité bronchique était systématiquement recherchée sur l'interrogatoire, les épreuves fonctionnelles respiratoires et le test de provocation à la métacholine le cas échéant. La présence d'une allergie était recherchée sur la concordance de l'interrogatoire et de tests cutanés positifs. La notion d'intolérance aux AINS était uniquement basée sur l'interrogatoire.

Afin d'évaluer la sévérité de la PNS, l'intensité des symptômes était mesurée par une échelle visuelle analogique (de 0 à 10, 10 correspondant à la gêne fonctionnelle maximale). La taille des polypes était mesurée au cours de l'endoscopie préopératoire sans rétraction muqueuse selon le score de Lildholdt (Figure 3) (5). Une TDM naso-sinusienne sans injection réalisée moins de 15 jours avant l'intervention en vue d'une radionavigation permettait

d'analyser l'importance des opacités muqueuses selon le score de Lund-Mackay (Tableau 1) (6).

L'ensemble des patients devait interrompre toute forme de corticothérapie locale ou générale au moins 1 mois avant l'intervention chirurgicale. Seuls les lavages de fosses nasales par des solutions salées étaient autorisés.

II. RECUEIL DES ÉCHANTILLONS

Les prélèvements issus des 93 patients inclus dans ce travail (objectifs 1 et 2) étaient utilisés pour les analyses histologiques, la mesure des marqueurs inflammatoires dans les sécrétions nasales et/ou l'immunophénotypage des EOs sanguins et tissulaires après purification cellulaire.

Les échantillons sanguins pour le comptage ou la purification des EOs étaient obtenus 3 semaines avant l'intervention sur tubes EDTA BD Vacutainer™ (BD medical, Franklin Lakes, NJ).

Les sécrétions nasales étaient collectées juste avant le début de l'intervention. Deux cotonoïdes de 1,27cm×2,54cm (Codamn, Raynham, MA) étaient placés dans chaque fosse nasale pendant 5 minutes puis étaient placés dans un tampon PBS (phosphate-buffered saline) pendant 1h à 4°C. Les sécrétions nasales étaient ensuite centrifugées à 1400 rotations par minute (rpm) pendant 8 min pour éliminer les composants cellulaires. Les surnageants destinés à la mesure des marqueurs de l'inflammation étaient aliquotés après dosage protéique selon la méthode de Bradford et conservés à -80°C.

Les polypes étaient obtenus au début de l'intervention, sous contrôle endoscopique avant décongestion muqueuse au sérum adrénaliné, par traction douce sur la base d'implantation avec une pince de Blakesley droite. Le polype le plus volumineux était utilisé et son conditionnement était ensuite adapté en fonction de l'analyse à effectuer. Pour le comptage cellulaire et l'analyse architecturale par coloration hématoxyline-éosine-safran (HES), un polype était fixé sur paraformaldéhyde 4% sur la nuit avant immersion dans la paraffine. Pour l'analyse immuno-histochimique, le polype était soit paraffiné, soit cryopréservé par immersion dans le 2-méthylbutane à -80°C. Pour le dosage protéique par ELISA des marqueurs d'inflammation, le polype conservé initialement à -80°C était soumis à

une dissociation mécanique par GentleMacs dissociator™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) puis centrifugé à 4000 rpm pour éliminer les débris tissulaires. Pour la technique de purification des EOs sur polype, le tissu était acheminé au laboratoire sur compresse humide pour une manipulation immédiate.

III. PURIFICATION DES EOSINOPHILES SANGUINS

Les EOs étaient purifiés par séparation selon un gradient de densité Percoll™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) et par sélection négative sur une colonne MACS LS Column™ (Miltenyi Biotec) pendant 30 min à 4°C avec des billes immunomagnétiques permettant d'isoler les monocytes-macrophages (anti-CD14), les neutrophiles (anti-CD16), les lymphocytes T, les cellules Natural Killer NK (anti-CD2). Cette technique préalablement décrite par Legrand *et al.* (128) permettait d'obtenir une pureté supérieure à 98% après coloration RAL 555 sur cytocentrifugation.

IV. PURIFICATION DES EOSINOPHILES DU POLYPE

Une adaptation du protocole initialement décrit par Nissim Ben Efraim *et al.* (129) a été nécessaire en vue de l'immunophénotypage par cytométrie en flux. Les auteurs décrivaient 2 méthodes de sélection des EOs issus de polypes nasaux : l'une par sélection positive CCR3+ permettant d'obtenir une pureté supérieure à 90% mais une viabilité de 63% ; l'autre par sélection négative $CD3^-/CD14^-/CD16^-$ permettant d'améliorer la viabilité à 88% au détriment de la pureté à 66%. La méthode par sélection négative a été choisie dans notre étude afin de privilégier la viabilité cellulaire. Une mise au point technique sur 10 premiers patients a été nécessaire pour obtenir des échantillons de pureté entre 70 et 80% (Figure 6).

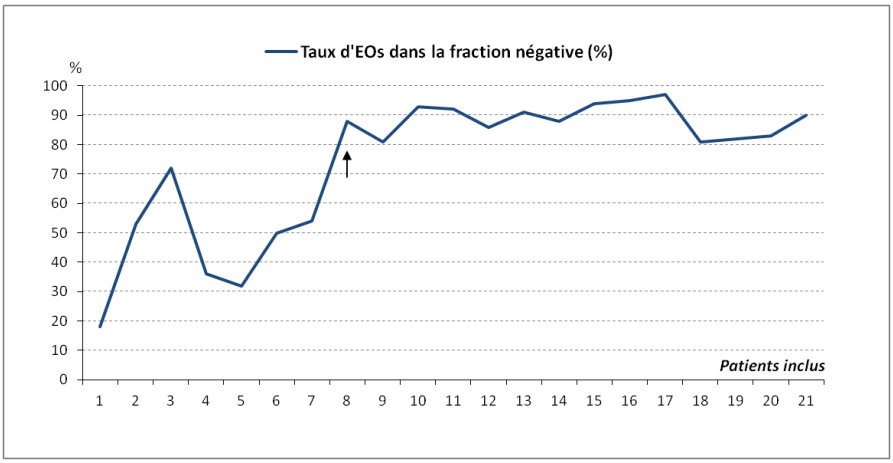


Figure 6: Evolution du taux de pureté des populations d'éosinophiles obtenues par sélection négative sur polype.
Les mises au point techniques de dissociation du polype et de sélection cellulaire ont permis d'obtenir après le 8ème patient testé des taux de pureté supérieurs à 80%.

Une phase de dissociation mécanique par GentleMacs dissociator™ (Miltenyi Biotec) était ajoutée dans notre protocole à la phase de digestion enzymatique du polype préalablement fragmenté. Le nombre, la concentration et la durée d'incubation des enzymes ont du aussi être modifiés afin de réduire la souffrance cellulaire et l'abrasion membranaire des EOs. Le tissu dissocié mécaniquement était ainsi incubé 1h à 37°C avec de la collagénase type-II (2mg/g de tissu) et de la Dnase I (80 µg/g de tissue) (Invitrogen, Carlsbad, CA) dans du milieu RPMI 1640 supplémenté (sérum de vœu fœtal 2%, HEPES 25 mM, L-glutamine 2mM, sodium pyruvate 10 nM, gentamycine 10 µg/ml). La phase de filtration utilisait 2 filtres nylon de diamètre décroissant (300 µm puis 70 µm) pour optimiser l'élimination des débris (Tableau 3). La viabilité cellulaire après coloration RAL 555 sur cytocentrifugation était supérieure à 75%.

Tableau 3 : Comparaison des protocoles de préparation des polypes en vue de la purification des éosinophiles.

	Nissim Ben Efraim et al.	**Notre protocole**
Dissociation mécanique	Non	Oui
Enzymes (concentration en g de tissu)	Collagénase type I (6mg/g) Hyaluronidase (3mg/g) DNAse (100µg/g)	Collagénase type II (2mg/g) × DNAse (80µg/g)
Mode d'incubation	90 min à 37°C	60 min à 37°C
Filtration	1 filtre de 150 µm	1 filtre de 300 µm puis 1 filtre de 70 µm

La phase de sélection négative sur colonne était aussi modifiée afin d'améliorer la pureté cellulaire. Une incubation était réalisée pendant 30 min à 4°C avec des billes immunomagnétiques anti-CD326, anti-CD105, anti-CD2 (permettant respectivement d'éliminer les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les cellules NK) (Miltenyi Biotec) et un dispositif commercial Eosinophil isolation kit™ (Miltenyi Biotec). Le mélange était ensuite soumis à un tri cellulaire magnétique sur colonne MACS LD Column™ (Miltenyi Biotec). La pureté cellulaire de l'éluat obtenu après lavage était mesurée par compte cellulaire automatique (Countess™) (Invitrogen).

La purification cellulaire s'accompagnait d'une perte cellulaire globale. Avec $32{,}5.10^6$ cellules en moyenne (de 13 à 85.10^6) sur le produit obtenu après dissociation mécanique et digestion enzymatique du polype, on retrouvait $18{,}6.10^6$ cellules en moyenne (de 8,9 à $45{,}4.10^6$) après purification par addition des fractions négative et positive. Le rendement de purification moyen était estimé à 48%. Le taux moyen d'EOs sur la fraction négative après purification (74,2%+/-23,5%) était augmenté de 4,5 fois par comparaison au taux moyen d'EOs mesuré sur le produit obtenu après dissociation mécanique et digestion enzymatique du polype (16,4%+/-14,6%) (Figure 7).

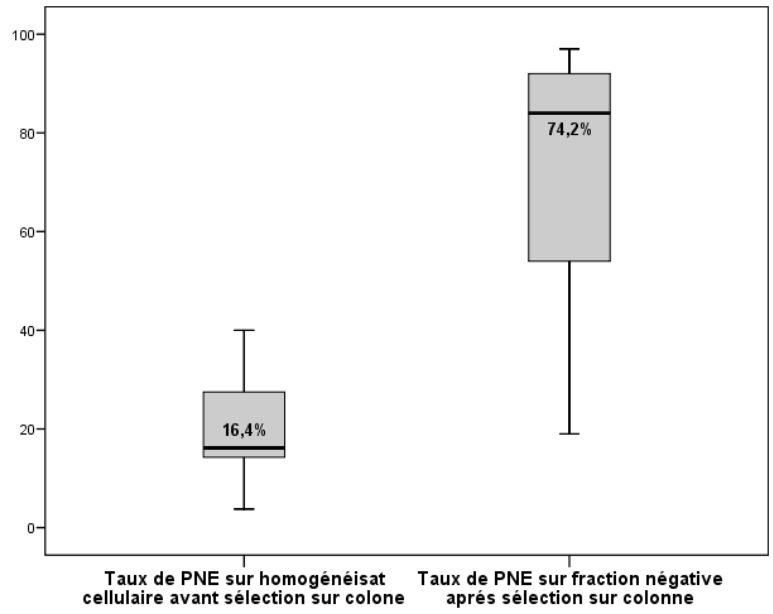


Figure 7: Comparaison des taux d'éosinophiles avant et après passage de l'homogénat sur colonne de purification.
(PNE = polynucléaire éosinophile)

V. IMMUNOPHÉNOTYPAGE DES EOSINOPHILES PURIFIÉS.

Les échantillons étaient analysés sur cytomètre BD Accuri™ C6 (BD biosciences, San José, CA). Au moins 10^4 événements devaient être obtenus pour chaque analyse. La pureté proche de 100% des EOs obtenus par sélection négative sur le sang permettait d'être assuré de la qualité du ciblage cellulaire par double diffusion FSC et SSC. Concernant les EOs obtenus par sélection négative sur polype, la pureté moindre nécessitait que le ciblage cellulaire en cytométrie soit amélioré. Une technique de double marquage était utilisée. Après un marquage membranaire par l'anticorps d'intérêt ou son isotype conjugué à un fluorochrome pendant 25 min dans le noir, les EOs (2.10^5 par condition) étaient lavés dans du tampon PBS puis fixés pendant 10 min à 4°C dans du paraformaldéhyde 2% (Thermoscientific, Waltham, MA). Ils étaient ensuite perméabilisés pendant 10 min à température ambiante avec de le PBS + saponine 0,01% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Un blocage des sites non spécifiques de marquage était réalisé avec 5 µl de sérum de souris pendant 10 min. Les EOs étaient alors identifiés en cytométrie après incubation avec l'anticorps anti-EPO spécifique de l'EO ou l'isotype contrôle biotinylé pendant 30 min puis la streptavidine couplée à la phycoérythrine (Molecular Probes, Eugene, OR) pendant 20 min en présence de saponine (Figure 8).

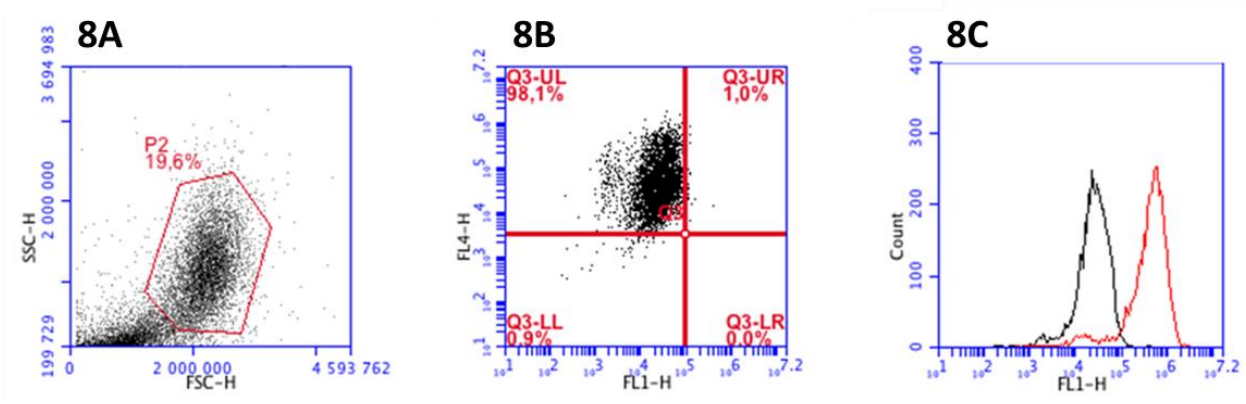


Figure 8: Ciblage de la population éosinophile par double marquage.
Après sélection de la population d'intérêt par double diffusion FSC et SCC (8A), le marquage anti-EPO PE permet de sélectionner les EOs (cadran Q3-UL) (8B). Une analyse spécifique des EOs était alors possible, ici par marquage membranaire CD69-FITC (8C).

VI. MISE EN CULTURE DES EOSINOPHILES PURIFIÉS LORS DES TESTS FONCTIONNELS *IN VITRO.*

Une partie des EOs purifiés (1.10^5 à 4.10^5 par condition) était incubée à 37°C et 5% CO_2 dans du milieu RPMI 1640 supplémenté (sérum de vœu fœtal 2%, HEPES 25 mM, L-glutamine 2mM, sodium pyruvate 10 nM, gentamycine 10 µg/ml) pour les analyses d'apoptose et d'immunomodulation. Les durées de mise en culture et les concentrations en IL-5, en IL-9 et en éotaxine (Peprotech, Rocky Hill, NJ) étaient déterminées suite à des études préliminaires réalisées dans le cadre d'autres travaux du laboratoire explorant l'implication des EOs dans la défense anti-tumorale (128).

VII. ANALYSES STATISTIQUES.

L'ensemble des données étaient recueillies sur une base de données anonymisée Microsoft Excel™. Les analyses statistiques étaient menées avec le logiciel SPSS™ v15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Les moyennes et les déviations standards étaient reportées pour les statistiques descriptives. Le test du Chi-2 était utilisé pour la comparaison de données démographiques. Le test non paramétrique de Wilcoxon était utilisé pour comparer les moyennes d'échantillons appariés. Les tests non paramétriques de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis étaient utilisés pour la comparaison des moyennes de groupes non appariés. Les analyses de corrélation étaient menées avec le test de Pearson (coefficient de corrélation *rho*). Le seuil de significativité statistique retenu était $p \leq 0,05$.

RESULTATS

I. OBJECTIF 1 : DÉFINIR LES PROFILS PHÉNOTYPIQUES HISTOLOGIQUES DANS LA POLYPOSE NASO-SINUSIENNE

L'article détaillé correspondant à cet objectif 1 est en repris dans cette section (Mortuaire *et al. Histopathological classification of refractory chronic rhinosinusitis with nasal polyps.* Histology and Histopathology).
Soumis le 23 Septembre 2014, 1ère révision 23 décembre 2014, 2ème révision 10 mars 2015, accepté le 09 avril 2015.

I.A. Contexte

L'infiltration en EOs dans le chorion des polypes est un élément quasiment pathognomonique de la PNS dans la population caucasienne. La présence d'un œdème est aussi caractéristique sur la plan macroscopique et microsocopique (69). L'intérêt d'une analyse plus précise de la muqueuse reste à démontrer. Plusieurs publications ont proposé de définir différents types de structure inflammatoire par analyse rétrospective de séries de patients (68)(70)(130). L'interprétation de ces résultats est sujette à discussion dans la mesure où les patients inclus présentaient pour certains une forme particulière de sinusite fongique allergique ou une rhinosinusite chronique sans véritable polype. Une étude comparait les polypes de patients sans tenir compte des traitements anti-inflammatoires ou antibiotiques en cours (68). Enfin ces éudes ne tenaient pas compte dans leur classification des co-morbidités associées comme l'asthme et l'intolérance aux AINS.

Notre objectif est d'établir une classification des polypes dans la PNS sur la base d'une analyse descriptive histologique exhaustive en relation avec le contexte clinique. L'association à un asthme détermine-t-elle un phénotype tissulaire particulier ?

I.B. Résultats

I.B.1. Population

Durant 6 mois, 36 patients avec une PNS résistante au traitement médical étaient inclus de manière prospective. Après un sevrage d'au moins 1 mois de tout traitement

corticoïde topique et systémique, un polype était prélevé lors du geste d'ethmoïdectomie ou de polypectomie endoscopique programmé dans le cadre de la prise en charge thérapeutique. Deux groupes de patients avec (n=21) ou sans (n=16) pathologie asthmatique étaient définis. Hormis l'allergie plus fréquente dans le groupe dit asthmatique, il n'existait pas de différence entre les 2 groupes en termes d'âge, de sexe, de consommation tabagique. La durée d'évolution avant chirurgie dans notre centre et les antécédents de chirurgie étaient comparables. Il n'y avait pas de différence en termes de sévérité clinique, endoscopique et tomodensitométrique entre les 2 groupes.

I.B.2. Classification histologique des polypes

L'utilisation d'une grille de lecture standardisée (Tableau 1 article 1) sur lames colorées HES avec analyse indépendante menée par 2 observateurs entraînés en microscopie optique permettait de classer les polypes en 3 groupes sur la base de l'infiltration cellulaire du chorion et de l'aspect œdémateux ou fibreux du polype. Le polype dit « œdémateux » principalement observé (n=23) était très riche en EOs et présentait une distension œdémateuse majeure du chorion. Le polype dit « intermédiaire » (n=10) était aussi majoritairement infiltré par des EOs et présentait un chorion composite contenant de l'œdème et une trame collagène plus prononcée. Le polype dit « fibreux » était plus rarement observé (n=3). L'infiltration cellulaire était mixte, éosinophile et lymphocytaire. Le chorion était surtout caractérisé par une trame fibreuse.

I.B.3. Relation entre la classification histologique établie et les caractéristiques muqueuses et sous muqueuses du polype

Les différents paramètres structuraux de l'épithélium et du chorion évalués selon une échelle gradée de 0 à 3 étaient comparés avec les 3 types de polypes définis. La membrane basale était statistiquement plus épaisse dans le polype fibreux. Les glandes séro-muqueuses du chorion étaient significativement plus abondantes dans les types intermédiaire et fibreux. Les autres paramètres (érosion ou hyperplasie épithéliales, métaplasie malpighienne, hyperplasie des cellules à mucus, hyperplasie des glandes à mucus) étaient comparables pour les 3 types de polype.

I.B.4. Relation entre la classification histologique établie et le statut clinique des patients

La proportion relative des populations cellulaires constituant l'infiltration inflammatoire du chorion était différente selon le statut bronchique des patients. La présence d'un asthme était associée à une plus grande éosinophilie. L'absence de pathologie asthmatique était associée à une infiltration lymphocytaire plus importante. Il n'existait pas de relation statistique entre la distribution cellulaire et les autres paramètres cliniques (âge, sexe, allergie, tabagisme, antécédent de chirurgie, sévérité et ancienneté de la PNS. Concernant les 3 types de polypes décrits, leur répartition n'était pas différente quel que soit le statut clinique des patients.

I.C. Synthèse

Il existe différents types morphologiques de polype au sein de la PNS. En dehors d'un infiltrat en EOs plus important en cas d'asthme associé, le statut clinique des patients ne détermine pas un phénotype tissulaire particulier.

I.D. Article 1

Histopathological classification of refractory chronic rhinosinusitis with nasal polyps.

Geoffrey Mortuaire, MD [1, 2]; Xavier Leroy, MD PhD [3]; Isabelle Gengler, MD [1]; Dominique Chevalier, MD [1]; Lionel Prin MD PhD [2]; Aurore Picry MD[1]

[1] Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery Department, University Hospital of Lille, France

[2] EA 2686- French Eosinophil Network, University Hospital of Lille, France.

[3] Pathology Department, University Hospital of Lille, France

---

SUMMARY

Objective: To delineate the histopathological characteristics of nasal mucosa in refractory chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) in order to demonstrate subtypes of nasal polyps and their potential relation with lower airway comorbidity.

Study Design: Clinical- and pathological-based cross-sectional study

Methods: Nasal polyp specimens were prospectively collected from patients with refractory CRSwNP referred to our institution for endoscopic sinus surgery. Oral and topical steroid were stopped 1 month before surgery. The pathological analysis was conducted by 2 independent reviewers with light microscopy on Hematoxylin-Eosin-Saffron stained slides. Each observer fulfilled a standardized protocol with cell count and stromal characterization on the most representative field. Mean grading scores were established. Morphological aspects were compared with the cell distribution and the clinical conditions.

Results: Among 36 patients, three subtypes of nasal polyps were depicted: eosinophilic edematous (64%), fibrous (9%) and intermediate with mixed edematous and collagen stromal structure (27%). Basement membrane thickening and seromucous gland hyperplasia were observed in the fibrosis sub-type ($p<0.03$). Eosinophilic mucosal infiltrate was significantly increased ($p=0.026$) in patients with concomitant pulmonary disease (n=21). Nasal polyp distribution was not influenced by asthma, allergy, previous surgery and smoking.

Conclusion: Our 3-subtype classification of refractory CRSwNP in Caucasian population shows a predominant edematous structure whatever the clinical conditions may have been. Eosinophilia as a major factor of adaptive immune response in nasal inflammation is a feature of concomitant pulmonary disease. Further studies concerning mucosal remodelling and outcome assessment after sinus surgery are required to evaluate the impact of our classification on a daily basis.

Running Title: histological grading in nasal polyposis

Key words: Nasal polyps, eosinophil, histological classification, asthma

INTRODUCTION

Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is an inflammatory disease of the nose and paranasal sinuses mucosa with symptoms lasting more than 12 weeks (Fokkens *et al.*, 2012). With a prevalence from 2 to 4 % in the general population, CRSwNP has a significant impact on the quality of life and is characterized by a variable response to corticosteroids with potential recurrences leading to surgery (Klossek *et al.*, 2005; Mortuaire *et al.*, 2010; Fokkens *et al.*, 2012). The impact of allergy is controversial as allergy incidences in CRSwNP and general population are equal (Fokkens *et al.*, 2012). Asthma or lower airway hyperreactivity observed in 42% of cases could delineate a specific group of patients with a more severe disease (Klossek *et al.*, 2005; Fokkens *et al.*, 2012).

Although the pathogenesis of CRSwNP is still poorly understood, a massive eosinophilic mucosal infiltrate is considered to be one of the histologic hallmarks of this disease in Caucasian population (Bachert *et al.*, 2001). It is still unclear whether a more precise histopathological categorization of nasal polyps, regarding the clinical status of patients could have implications for treatment and outcomes. Several studies have already been published about the morphological characterization of chronic nasal mucosa inflammation (Berger *et al.*, 2002; Couto *et al.*, 2008; Soler *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2011). A predominant edematous and eosinophilic structure was often described (Couto *et al.*, 2008). However, the results can be misinterpreted as patients with different diseases (CRS with or without polyps, allergic fungal sinusitis) were included (Berger *et al.*, 2002; Payne *et al.*, 2011). In a recent study, histological analyses were performed on nasal polyps collected during sinus surgery in patients regardless of ongoing oral corticosteroid or antibiotics therapies (Soler *et al.*, 2009). At last, those studies did not compare histopathological phenotypes with relevant clinical data like asthma or allergy.

Herein, we described the detailed histopathological findings from a cross-sectional study of patients undergoing endoscopic sinus surgery for refractory CRSwNP, without any previous drug therapy. Using strict observation rules through optic microscopy, we proposed to classify these nasal polyps exhaustively in accordance with morphological criteria encountered in the literature.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A prospective study was conducted including 36 patients with refractory CRSwNP. The diagnosis was established according to the EPOS criteria (Fokkens *et al.*, 2012). The patients

were addressed in our department for persistent symptoms despite optimal medical treatment (at least 3 courses of 7-day oral corticosteroid and maximum dose of topical nasal corticosteroid spray). Age, gender and history of prior sinus surgery were obtained from clinical record. Concomitant asthma or lower airway hyperreactivity (diagnosed respectively by spirometric measurement of forced expired volume in one second/vital capacity ratio or by metacholine bronchial challenge test), allergy (diagnosed by an allergy focused history in conjunction with skin prick testing) and history of acetylsalicylic acid (ASA) intolerance were systematically assessed. No case of chronic obstructive pulmonary disease caused by smoking was recorded. Adult patients (≥ 18 years old) were enrolled after maximum medical management failure and surgery indication. The burden of sinonasal symptoms was measured by visual analogical scale (VAS) with 0 = no symptom. Patients with immunodeficiency, autoimmune disease and/or cystic fibrosis were excluded. A procedure of endoscopic sinus surgery was scheduled for each patient.

To improve the homogeneity of the population, any kind of medical therapy (oral and topical nasal corticosteroid), except nasal douching, was stopped at least one month before surgery.

A written informed consent was obtained from each patient. The protocol was agreed according to institutional requirements for routine histopathological studies. The day before surgery, a computed tomography (CT) scan was performed to evaluate sinus opacifications with the Lund-Mackay score (maximum total score: 24) (Lund *et al.*, 1993). The nasal polyp size was endoscopically measured using a 30-degree rigid nasal fiberoptic scope according to the Lildholdt grading system (0-absence of nasal polyps, 1-nasal polyps in middle meatus only, 2-nasal polyps beyond the middle meatus but not reaching the inferior edge of the inferior turbinate, 3-nasal polyps completely obstructing the nose) (Lidholdt *et al.*, 1995).

Tissue preparation and staining

Nasal polyps were obtained at the beginning of the surgical procedure. Through endoscopic view, one nasal polyp was gently removed from the middle meatus for each patient and fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C. Standard tissue dehydration in graded alcohol solutions and embedment in paraffin blocks were undergone with Shandon® Excelsior ES Tissue Processor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Thereafter, blocks were cut into 3-µm thick sections with RM2155® rotary microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and put on Superfrost® Plus Micro Slides (VWR International, Radnor, PA). Subsequently, samples were deparaffinized, cleared in xylene and rehydrated through graded series of alcohol. Hematoxylin-Eosin-Saffron (HES) staining was obtained with the

Tissue-Tek® Prisma®/Film® Automated Slide Stainer and Coverslipper (Sakura Finetechnical Co, Tokyo, Japan).

Histologic scoring

A microscopic review was performed by two trained authors (G.M. and A.P.) using a binocular Leica DM4000B® microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Panels of 4 slides from sections of the distal part of the nasal polyp were randomly selected for subsequent observations. The pathologic review was done in a blinded fashion in regard to all clinical data. Two slides were assigned to each observer. The different items evaluated were chosen according to the criteria used in pathologic practice and in the literature to assess nasal mucosa (Table 1). At 400× power, cell infiltrates were measured on a field of 250 µm × 250 µm, yielding an area of approximately 0.13 mm^2. Each observer used a cell-counter to define the mean proportions of cell population by high-power field (percentage of cell types for a count of 100 cells) on the most representative field of the 2 assigned slides. Correlations between the two observers' counts were checked before setting an average cell count for each patient. Epithelial and stromal structures were assessed through 100× to 400× magnifications. Specific grading scales were used for each item (Table 1). In case of grading discrepancy between the two observers, an agreement was set by a third certified author (X.L.). Maximal basement membrane (BM) thickening was measured with the most optimal transverse mucosal histologic orientation and recorded as < 5µm, 5–15 µm and > 15µm with a graduated reticle mounted within one of the eyepiece objectives.

The mean percentage difference of the 2 major cells components (eosinophil and T/plasma cell) and the mean grading score difference in terms of stromal structure for edema and fibrosis were used in a matrix approach. The polyp was considered as eosinophilic if a positive difference between eosinophil and T/plasma cell counts was observed.

Statistical analyses

Data were input into Microsoft Excel® and a statistical analysis was performed with SPSS® v 15.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Means, standard deviations (SD) or ranges were reported for descriptive statistics. The Chi-squared test was used for comparison of demographic data. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the means of non-paired samples. If a statistically significant difference among the groups was found, a post hoc analysis was followed by means of Mann-Whitney test. Correlation analyses for cell counts were conducted with the Pearson test (using *rho* as correlation coefficient). A two-tailed p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

From December 2013 to May 2014, 36 consecutive patients were included in our study (Table 2). As a major factor of disease outcome (Klossek *et al.*, 2005; Fokkens *et al.*, 2012), the respiratory status was used to delineate 2 groups of patients (patients with asthma or lower airway hyperreactivity disease (n= 21)). Patients with or without lower airway disease were comparable for age, gender, duration of CRSwNP before surgery in our institution and tobacco use. In terms of disease severity, mean VAS score, polyp score and CT scan opacification staging were not different in both patient groups. However, allergy was more frequent in patients with lower airway disease (p=0.027). Prior surgery was observed in 33% of these patients. This rate did not reach a significant statistical level.

Pearson correlation test was used to evaluate inter-observer cell count variability. *Rho* correlation coefficient ranged from 0.73 to 0.93 for the different cell subtypes ($p \leq 0.001$). Eosinophilic infiltrate was mainly observed in our population (mean percentage of 62%, SD: 20%). The mean percentages of T and plasma cells, macrophages and other cells were respectively 31%, 4.8% and 2.6%. The presence of eosinophils within the epithelial layer, often described in CRSwNP, was not associated with a more substantial eosinophilic infiltrate in the stroma.

Three sub-types of nasal polyps were defined using the matrix approach (Fig.1). We noticed a prominent group of patients (n=23) (64%) with eosinophilic edematous nasal polyps (called "edematous"). A second group (n=10) (27%) was characterized with eosinophilic infiltrate, concomitant edema and collagen structure (called "intermediate"). A third group was less prevalent (n=3) and showed a predominant fibrous structure with variable cell infiltrates (called "fibrous"). Edematous nasal polyps were characterized by broad intercellular spaces and eosinophilic gathering underneath the epithelial layer (Fig. 2A). Fibrous nasal polyps showed diffuse cell infiltrate with numerous seromucous glands and ductal structure in the stroma (Fig. 2B). Intermediate nasal polyps could be described as edematous polyps with a significant fibrous component (Fig. 2C). In 3 cases of edematous nasal polyps, we noticed a major T/plasma cell infiltrate. One of those 3 patients was previously followed for thrombocytopenia. No specific past history was noticed for the 2 other patients. To corroborate our classification, we compared the percentage of each cell between the 3 types of nasal polyp (Fig.3). Eosinophils were significantly enhanced in edematous and intermediate nasal polyps versus fibrous nasal polyps (respectively $p<0.02$ and $p=0.04$). Neutrophils were enhanced in fibrous nasal polyps in comparison with the

intermediate sub-type ($p<0.02$). The other cell types were evenly distributed or poorly observed.

The different criteria of our histo-morphological review were compared within the 3 subtypes of nasal polyps (Fig. 4A). By grading scale comparison, we showed that BM thickening was significantly increased in fibrous nasal polyps ($p<0.03$) (Fig. 4B). Seromucous glands were more abundant in fibrous and intermediate nasal polyps ($p<0.02$) (Fig. 4B). Goblet cell hyperplasia was evenly observed in the 3 subtypes of nasal polyps.

Histological findings were compared with the clinical status of CRSwNP patients. In patients with asthma or airway hyperreactivity, eosinophilic infiltrate was significantly increased ($p=0.026$). Inversely, the rate of T/plasma cells was increased in patients without concomitant respiratory disease ($p=0.043$). Noteworthy, the other types of cells were scarce with no difference in terms of distribution (Fig. 5). The cell composition was not influenced by the other demographic (age, gender) or clinical data (allergy, prior surgery, disease severity or duration, smoking). The 3 types of nasal polyps were equally distributed in patients with or without airway disease. The same results were observed for gender, allergy and smoking. Neither time to surgery in our institution nor past history of sinus surgery modified nasal polyp distribution. Meanwhile, metaplastic changes into squamous epithelium score were higher in patients with pulmonary disease ($p=0.02$). The impact of ASA intolerance could not be evaluated as only 3 patients were concerned.

DISCUSSION

With current advances in the immuno-phenotyping of tissues, the systematic pathological review of nasal polyps could be considered as basic assessment. Still, published studies about nasal polyp categorization are often blurring as they included different types of patients with different types of medical management before sample collection. In an attempt to give a new insight with clinical perspectives, we focused our study on a homogenous group of patients with refractory disease. CRSwNP was strictly diagnosed according to the EPOS criteria (Fokkens *et al.*, 2012). Topical and/or oral medical therapies were stopped one month before surgery to avoid inflammation dimming. To improve the quality of our sample collection, nasal polyps were gently removed by the same surgeon (G.M.) and histologic analyses were carried out caudally off the polyp attachment. Thereby, we avoided to harvest bony structures and thick adjacent mucosa. An optimal assessment of the polyp framework was achieved with a standardized protocol and a double evaluation by two independent reviewers with no awareness of the clinical data. Small inter-rater variability for cell counting

was confirmed by Pearson correlation test. In an attempt to reduce the heterogeneity in the results, means of counting cells and grading scores were established by each observer on the most representative field of 2 slides. Likewise, a third trained observer was called for grading scale measurement in case of disagreement between the first 2 observers.

With this approach, we were able to delineate 3 types of nasal polyps: edematous, fibrous and intermediate. A major edematous component was originally described in the literature, but with little concern about the influence of previous therapies on the histology of nasal polyps (Tos *et al.*, 1977; Davidsson *et al.*, 1993). Our results are in accordance with Couto *et al.* (2008) study. In 89 patients with sinonasal inflammation, the authors described edematous nasal polyps in 73% of cases and fibro-inflammatory nasal polyps in 18% of cases. Herein we delineate a third type of nasal polyp called intermediate. So far, the intermediate type was not reported in previous CRS histopathological studies. Given that the different histological features of nasal polyps may be found in the same sample, the authors usually preferred to describe the most relevant structure observed (Couto *et al.*, 2008). We chose to take heed of this mixed structure in our classification to reduce subjectivity in the histological assessment. Basement membrane thickening and seromucinous gland abundance were displayed mostly in nasal polyps with a fibrous component. Basal membrane thickening indicates long-lasting inflammation and is considered a marker of airway remodelling (Watelet *et al.*, 2004). Berger *et al.* (2002) showed substantial hyperplasia of submucosal glandular structure in non-edematous inflammed tissue of 29 patients with CRS. Similar results were observed by Payne *et al.* (2011). We assume that major remodelling processes observed in patients with fibrotic nasal polyps could lead to a thicker mucosal structure with excretory glandular ducts obstruction and seromucous glands hyperplasia. It is worth noticing that intermediate and fibrous nasal polyps were observed in patients both with and without prior surgery. Thus, previous mucosal resection does not necessarily imply wound healing processes with thicker mucosa. Nasal polyps with stromal atypia described by Couto *et al.* (2008) were not observed in our patients.

Eosinophilic stromal infiltrate predominantly observed in our patients is typical of CRSwNP in Caucasian population (Fokkens *et al.*, 2012). With a reliable quantification technique of eosinophils counting, Bhattacharyya *et al.* (2001) showed relatively strong correlations between CT scan stage and tissue eosinophilia in CRS. Although eosinophilia was associated with edema in our nasal polyp classification, neither CT scan score nor nasal polyp size were correlated with eosinophils count (data not shown). As our population was composed of patients with a refractory disease, CT scan and polyp scores were high for all of

them (Table 2). This bias could account for the lack of correlation between eosinophilia and the staging systems. Further studies revealed that plasma cells were also abundant in nasal polyps indicating an elevated production of immunoglobulins (Polzehl *et al.*, 2006). We showed that T cells and plasma cells were the second most common type of cell population in our study. These results corroborate the immunopathological hypothesis of an adaptive immune response to local allergens in nasal polyps. This immune response leads to immunoglobulin E and A release by B cells, pro-inflammatory cytokine production by T and epithelial cells and eosinophil recruitment (Bachert *et al.*, 2001). In 3 cases of edematous polyp, we observed a prevailing T/plasma cells population without obvious explanation. One of them was followed for a concomitant hematopoietic disorder. The impact of this comorbidity is difficult to explain as the 2 other patients with significant T/plasma cell infiltrate did not show any specific disorder. Intensive immune-regulatory processes counteracting eosinophil inflammation could be involved in those 3 patients.

As concomitant lower airway disease (asthma or airway hyperreactivity) associated with CRSwNP, is a major factor of disease severity and of poor outcomes in steroid resistant patients (Mendelsohn *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), we decided to focus our study on potential relations between the respiratory status of patients and histopathological findings. Like in previous studies, we showed that eosinophil infiltration was more prominent in the group of patients with lower airway disease (Dhong *et al.*, 2005; Soler *et al.*, 2009). Eosinophil mucosal recruitment and survival rely on mucosal release cytokines (*i.e.* interleukin-5) involved in the Th2-biaised immune adaptive response (Simon *et al.*, 1997). As blood and nasal interleukin-5 levels are increased in asthmatic patients (Bachert *et al.*, 2010), pronounced mucosal eosinophilic infiltrate could be considered as a marker of potential bronchial disease in CRSwNP patients. Even though we focused our study on patients with refractory CRSwNP and who underwent surgery, this specific relation between airway disease and eosinophilia underlines the impact of this predominant inflammatory process and the need for specific immune therapies for this patient sub-type. Several studies revealed that the accumulation of inflammatory cells could be different, depending on the geographical origin. Zhang *et al.* (2008) showed in Asian patients a neutrophil predominance with a different T-cell pattern. Our findings did not show major neutrophilic infiltrate in Caucasian population. It seems that distinct disease parameters and therapeutic approaches are needed for different types of CRSwNP inflammations.

Concerning the nasal polyp classification, we did not find a specific histopathological pattern for patients with lower airway disease. As described by Berger *et al.* (2002), patients

with airway disease were equally distributed in each nasal polyp subtype. Clinical biases were excluded in our study, as groups with or without lower airway disease were comparable in terms of demographic data, previous surgery or disease severity (Table 2). Allergy *per se*, more frequently observed in asthmatic patients, has already been described as poorly involved in CRSwNP pathophysiology (Kern, 1993; Fokkens *et al.*, 2012). Like in our study, Soler *et al.* (2009) showed that allergy was not associated with mucosal eosinophilia. Epithelial metaplasia was higher for patients with lower airway disease in our analysis. We assume that epithelial damage caused by inflammatory mediators could induce this cell proliferation via epithelial repair processes (Coste *et al.*, 1996). At last, smoking was not involved in any significant change in the histopathological characteristics of nasal polyps as previously described (Kule *et al.*, 2014).

CONCLUSION

With a rigorous histologic methodology and a strict selection of representative refractory CRSwNP patients free from steroid therapy before tissue collection, we have been able to delineate a 3-subtype histopathological classification of nasal polyps. Edematous polyp with eosinophilic infiltrate is the most prevailing pattern in the Caucasian population. No subtype of nasal polyp was predictive of a specific clinical status. Meanwhile, we emphasized that patients with concomitant asthma or lower airway hyperreactivity showed more eosinophils in the stromal compartment underlining the role of mucosal adaptive immune response in those patients.

Subsequent studies are required to further explore the potential impact of our nasal polyp classification on surgical outcomes in terms of tissue remodelling and symptom relief.

ACKNOWLEDGEMENTS

The help of Dr Juliette Beaujot and Dr Agnès Wacrenier, Pathology Department, University Hospital of Lille, France, for technical support and study design is gratefully acknowledged.

REFERENCES

Bachert C., Gevaert P., Holtappels G., Johansson S.G. and Van Cauwenberge P. (2001). Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 107, 607-614.

Bachert C., Zhang N., Holtappels G., De Lobel L., Van Cauwenberge P., Liu S., Lin P., Bousquet J. and Van Steen K. (2010). Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. J Allergy Clin Immunol. 126, 962-968.

Berger G., Kattan A., Bernheim J. and Ophir D. (2002). Polypoid mucosa with eosinophilia and glandular hyperplasia in chronic sinusitis: a histopathological and immunohistochemical study. Laryngoscope. 112, 738-745.

Bhattacharyya N., Vyas D.K., Fechner F.P., Gliklich R.E. and Metson R. (2001). Tissue eosinophilia in chronic sinusitis: quantification techniques. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 127, 1102-1105.

Coste A. , Rateau J.G., Roudot-Thoraval F., Chapelin C., Gilain L., Poron F., Peynegre R., Bernaudin J.F. and Escudier E. (1996). Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 122, 432-436.

Couto L.G., Fernades A.M., Brandão D.F., Santi Neto Dd., Valera F.C. and Anselmo-Lima W.T. (2008). Histological aspects of rhinosinusal polyps. Braz J Otorhinolaryngol. 74, 207-212.

Davidsson A. and Hellquist H.B. (1993). The so-called 'allergic' nasal polyp. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 55, 30-35.

Dhong H.J., Kim H.Y. and Cho D.Y. (2005). Histopathologic characteristics of chronic sinusitis with bronchial asthma. Acta Otolaryngol. 125, 169-176.

Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H., Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., Wang de Y. and Wormald PJ. (2012). EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. Rhinology. 50, 1-12.

Kern R.(1993). Allergy: a constant factor in the etiology of so-called mucous nasal polyps. J Allergy. 4, 483.

Klossek J.M., Neukirch F., Pribil C., Jankowski R., Serrano E., Chanal I. and El Hasnaoui A.(2005). Prevalence of nasal polyposis in France: A cross sectional, case-control study. Allergy. 60, 233-237.

Kule Z.G., Habesoglu T.E., Somay A., Deveci H.S., Kule M. and Gursel A.O. (2014). Histopathological characteristics of nasal polyps in smokers and non-smokers. J Craniofac Surg. 25, 946-949.

Lildholdt T., Rundcrantz H. and Lindqvist N. (1995). Efficacy of topical corticosteroid powder for nasal polyps: a double-blind, placebo-controlled study of budesonide. Clin Otolaryngol Allied Sci. 20, 26-30.

Lund V.J. and Mackay I.S. (1993). Staging in rhinosinusitus. Rhinology. 31, 183-184.

Mendelsohn D., Jeremic G., Wright E.D. and Rotenberg B.W. (2011). Revision rates after endoscopic sinus surgery: a recurrence analysis. Ann Otol Rhinol Laryngol. 120, 162-166.

Mortuaire G., Vandeville S. and Chevalier D. (2010). Psychometric evaluation of the SinoNasal Outcome Test-16 for quality of life in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. 127, 91-96.

Payne S.C., Early S.B., Huyett P., Han J.K., Borish L. and Steinke J.W. (2011). Evidence for distinct histologic profile of nasal polyps with and without eosinophilia. Laryngoscope. 121, 2262-2267.

Polzehl D., Moeller P., Riechelmann H. and Perner S. (2006). Distinct features of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. Allergy. 61, 1275-1279.

Simon H.U., Yousefi S., Schranz C., Schapowal A., Bachert C. and Blaser K. (1997). Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. J Immunol. 158, 3902-3908.

Soler Z.M., Sauer D.A., Mace J. and Smith T.L. (2009). Relationship between clinical measures and histopathologic findings in chronic rhinosinusitis. Otolaryngol Head Neck Surg. 141, 454-461.

Tos M. and Mogensen C.(1997). Pathogenesis of nasal polyps. Rhinology. 15, 87-95.

Watelet J.B., Bachert C., Claeys C. and Van Cauwenberge P. (2004). Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis. Allergy. 59, 54-60.

Zhang N., Van Zele T., Perez-Novo C., Van Bruaene N., Holtappels G., DeRuyck N., Van Cauwenberge P., and Bachert C. (2008). Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. J Allergy Clin Immunol. 122, 961-968.

Zhang Z., Linkin D.R., Finkelman B.S., O'Malley B.W. Jr, Thaler E.R., Doghramji L., Kennedy D.W., Cohen N.A. and Palmer J.N. (2011). Asthma and biofilm-forming bacteria are independently associated with revision sinus surgeries for chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 128, 221-223.

TABLES

Table 1: Overview of histologic inflammatory markers.

The analyses were performed on HES stained sections by 2 independent observers.

Inflammatory markers		Measurement
Cellular markers (× 400 magnification)	Eosinophils	Percentage (%) for 100 cells count
	T and plasma cells	Percentage (%) for 100 cells count
	Macrophages	Percentage (%) for 100 cells count
	Neutrophils	Percentage (%) for 100 cells count
	Mast cells	Percentage (%) for 100 cells count
	Basophils	Percentage (%) for 100 cells count
Mucosal structure (× 100 and × 400 magnifications)	Epithelial erosion	Grade 0,1,2,3 [a]
	Epithelial metaplasia	Grade 0,1,2,3 [a]
	Epithelial hyperplasia	Grade 0,1,2,3 [a]
	Globet cell hyperplasia	Yes/No
	Basement membrane thickening	< 5µm, 5-15 µm, >15 µm
	Eosinophil infiltrate*	Yes/No
Lamina propria structure (× 400 magnification)	Stromal edema	Grade 0,1,2,3 [b]
	Fibrosis	Grade 0,1,2,3 [b]
	Seromucous gland abundance	Grade 0,1,2,3 [b]
	Seromucous gland hyperplasia	Yes/No

[a] 0 = not present, 1 = focal (mild), 2 = patchy (moderate), 3 = extensive (marked).
[b] 0 = not present, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = marked
* presence of eosinophils within the epithelial layer

Table 2: Demographic and clinical characteristics of the population.

Apart from allergy (p=0.049), the 2 groups of patients (with or without lower airway disease) were comparable in terms of demographic characteristics and disease severity. *(*Chi-squared test).*

	Asthma or airway hyper-reactivity	**W/o lower airway disease**	***p*-value**
Population (n=36)(pts)	21	15	ns
Mean age (years)	50	48.8	ns
Sex ratio	15M/6F	13M/2F	ns
Duration of CRSwNP (years)	9.4	9.2	ns
Prior surgery (%)	33	6.6	ns
Allergy (%)	62	26.6	0.049*
ASA intolerance (pts)	3	-	-
Tobacco use (n=6)(pts)	2	4	ns
Mean polyp size score (/3)	2.47	2.46	ns
Mean CT scan score (/24)	18.2	17.7	ns
Mean VAS score (/10)	8.1	7.2	ns

FIGURES

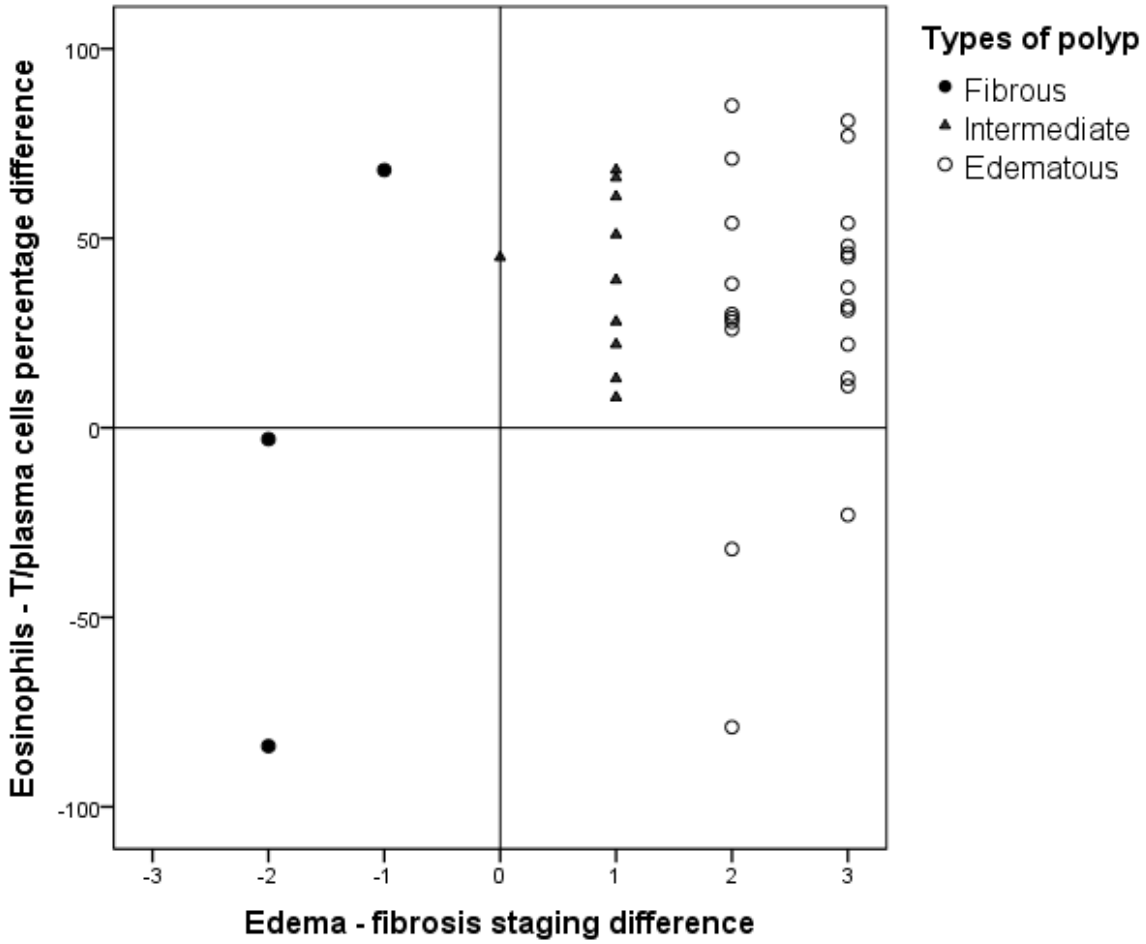


Figure 1: Nasal polyp classification according to eosinophil infiltrate and stromal framework

The eosinophil infiltrate and the relative edema/fibrosis grading difference were simultaneously assessed. Three types of nasal polyp were observed: edematous (○) (n=23), intermediate (▲) (n=10) and fibrous (●) (n=3).

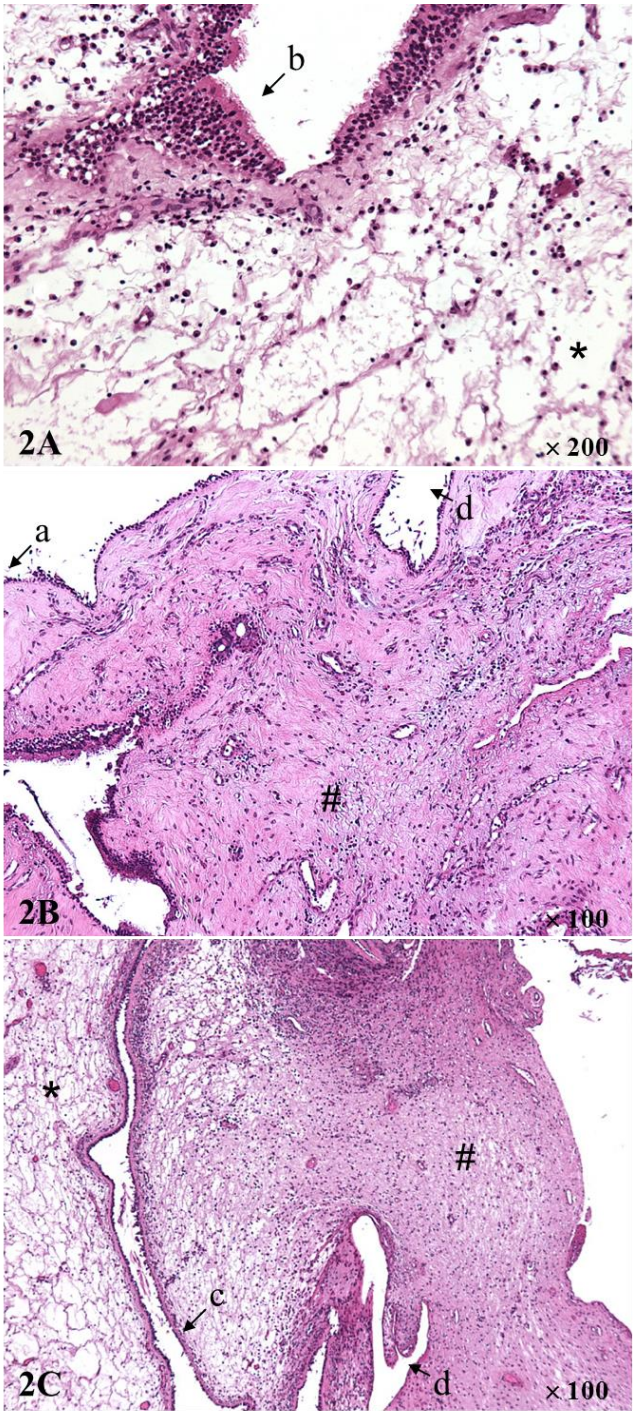


Figure 2: Microscopical depictions of the nasal polyp classification (×100 and ×200)

Edematous nasal polyp was described as a massive stromal eosinophil infiltrate with edema (*) (2A). Fibrous nasal polyp was characterized by collagen structure (#) (2B). Intermediate nasal polyp was eosinophilic with a mixed composition of the stroma (2C). Different features were evenly observed in the 3 types of nasal polyp: complete epithelium desquamation (a) or hyperplasia (b), basement membrane thickening (c), submucosal seromucous gland hyperplasia (d).

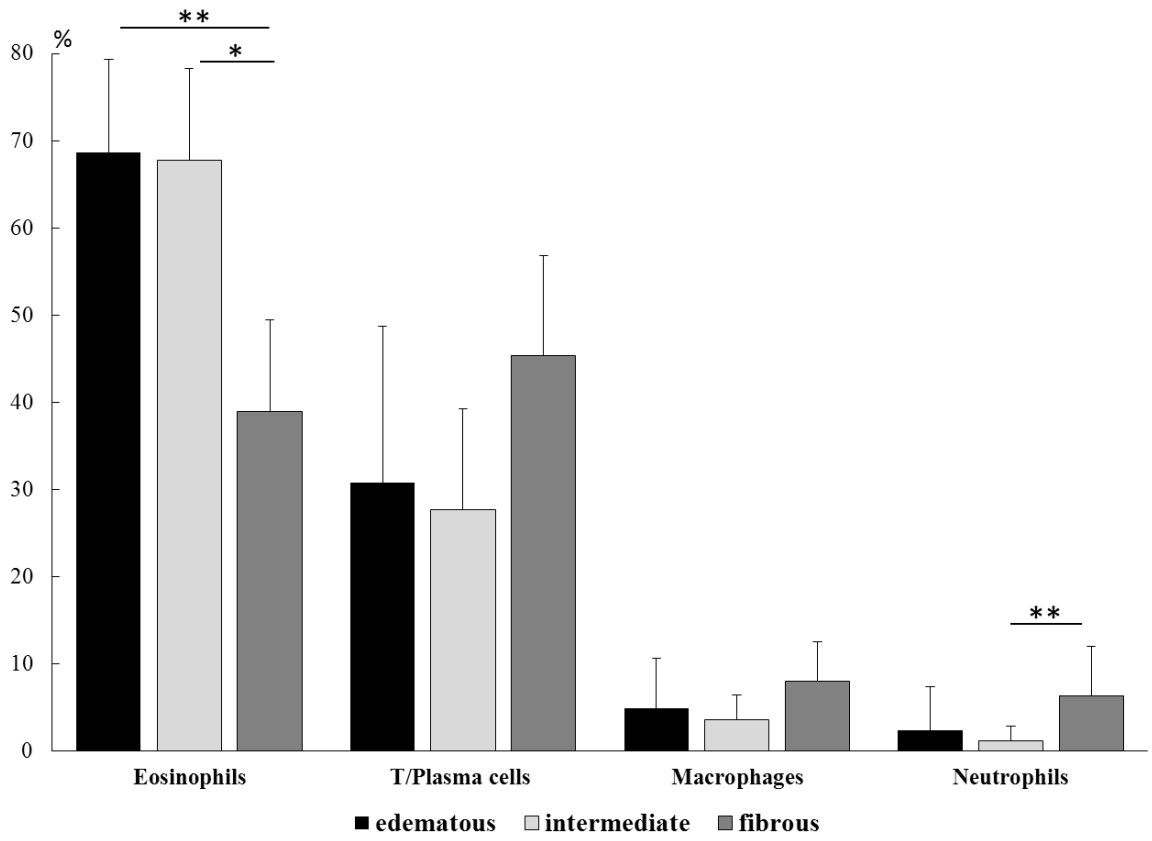


Figure 3: Cells distribution in the 3-subtype nasal polyp classification.

Eosinophils were significantly more present in edematous and intermediate nasal polyps (** p<0.02, *p=0.04). Neutrophils were observed more frequently in fibrous nasal polyps (** p <0.02) *(Mann Whitney test)*. Bar values and error bars represent respectively means and standard errors of the mean (SEM).

4A

Histopathological features	p-value *(Kruskal Wallis test)*
Epithelial erosion	ns
Epithelial hyperplasia	ns
Metaplastic changes	ns
Basement membrane thickness	**0,041**
Seromucous glands abundance	**0,002**

4B

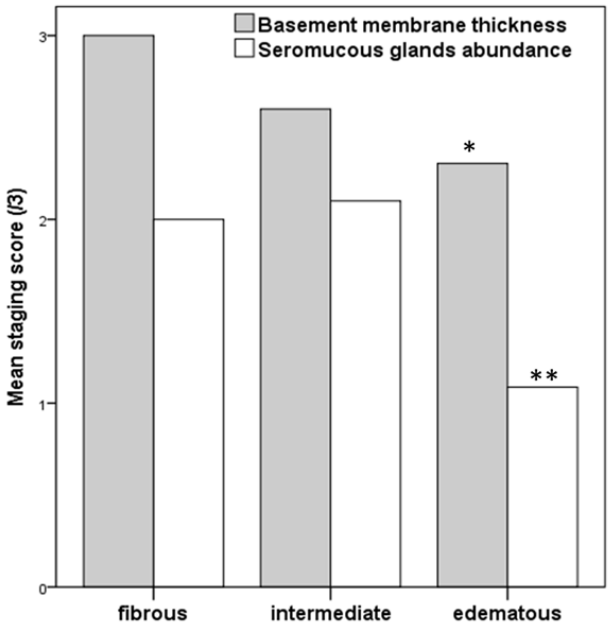


Figure 4: Relation between nasal polyp classification and histopathological features.

BM thickness and seromucous gland abundance scores were differently distributed (4A). Post hoc analysis showed that BM was significantly thicker in fibrous type in comparison with edematous type (* $p<0.03$). Seromucous glands were scarce in edematous type in comparison with the 2 other types (** $p<0.02$) (4B) *(Mann Whitney test).).* Bar values and error bars represent respectively means and SEM.

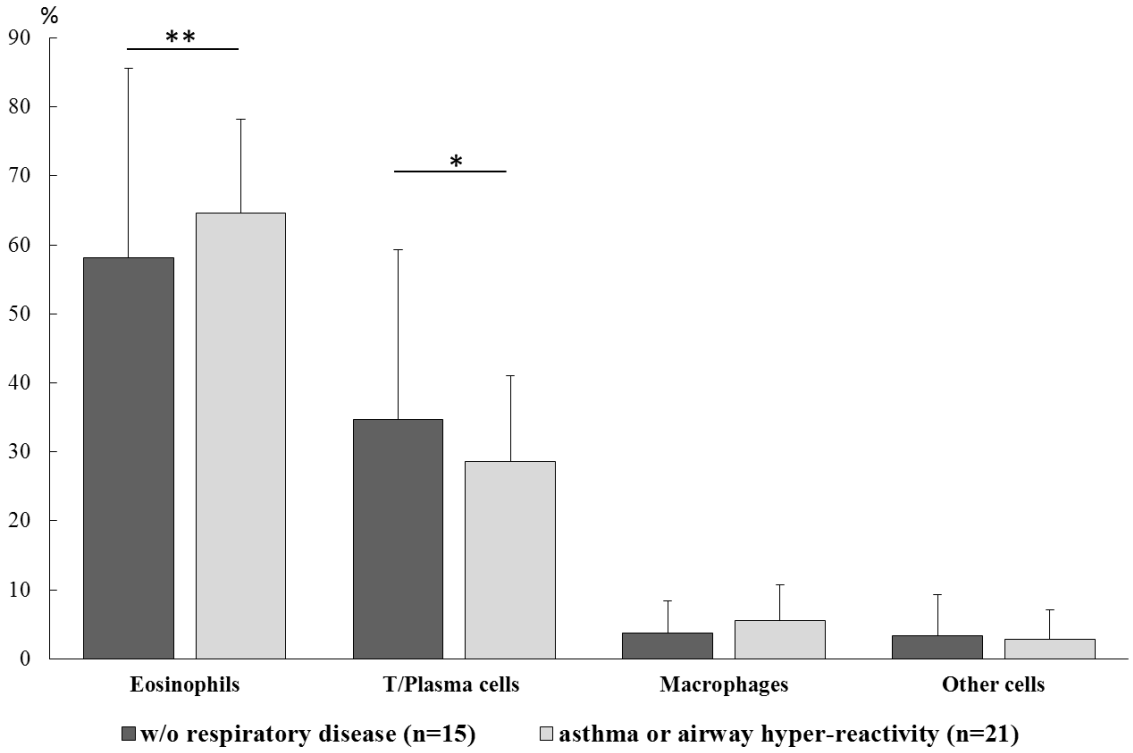


Figure 5: Stromal cell distribution in nasal polyps according to lower airway status.

We showed that eosinophils were more abundant in patients with asthma or lower airway hyper-reactivity (** p=0.026) whereas T and Plasma cells were inversely more frequent in patients without lower airway disease (* p=0.043) *(Mann Whitney test)*. Bar values and error bars represent respectively means and SEM.

II. OBJECTIF 2: DEFINIR LES PROFILS PHENOTYPIQUES BIOLOGIQUES ET LES FACTEURS D'IMMUNO-MODULATION DANS LA POLYPOSE NASO-SINUSIENNE

L'article détaillé correspondant à cet objectif 2 est repris dans cette section (Mortuaire *et al. Immune profile modulation of blood and mucosal eosinophils in nasal polyposis with concomitant asthma.* Annals of Allergy, Asthma and Immunology. 2015 Feb 19. pii: S1081-1206(15)00043-5. doi: 10.1016/j.anai.2015.01.012).

Soumis le 22 Octobre 2014, révision le 1er Décembre 2014, accepté le 23 janvier 2015.

II.A. Contexte

Alors qu'il ne semble pas exister de phénotype tissulaire spécifiquement associé à l'asthme, on constate que l'éosinophilie tissulaire est particulièrement prononcée en cas de pathologie bronchique associée à la PNS. L'asthme étant associé dans la littérature à la cortico-résistante conduisant à la chirurgie (109)(110), une exploration des mécanismes de cette éosinophilie au cours de la PNS semble être nécessaire. L'infiltration de la muqueuse nasale par les EOs nécessite le recrutement de ces cellules depuis le compartiment sanguin par migration trans-endothéliale et la mise en jeu de mécanismes de survie tissulaire.

Les protéines d'adhérence tissulaire ont été décrites comme essentielles dans l'interaction des EOs avec les parois vasculaires et la matrice extracellulaire tissulaire (40)(72). Les béta1 (β_1) intégrines (lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1 ou CD11a/CD18), les β_2 intégrines (very late antigen-4 (VLA-4 ou CD49b/cd29) et le CD44 ont ainsi été étudiés dans l'inflammation bronchique à EO au cours de l'asthme (131)(132)(133). L'exploration de ces mécanismes de domiciliation reste partielle dans la PNS.

Comme évoqué en introduction, la survie et l'activation tissulaire des EOs sont largement tributaires de l'IL-5. L'efficacité limitée des thérapies ciblées anti-IL-5 (99)(100) nous incite à rechercher d'éventuels mécanismes d'immuno-modulation déjà observés dans l'asthme impliquant le récepteur de l'IL-5 (115)(116). L'IL-9, par son rôle de régulateur dans la signalisation IL-5 dépendante dans l'asthme (124), est un acteur potentiel de cette immuno-modulation (125). Son rôle dans la PNS n'a pas été étudié.

L'asthme associé à la PNS détermine-t-il sur le plan tissulaire un profil cytokinique et une réponse immunitaire spécifique à l'origine de l'hyperéosinophilie ?

II.B. Résultats

II.B.1. Population

Sur 3 ans, étaient inclus 93 patients pour lesquels une ethmoïdectomie endoscopique ou une polypectomie étaient programmées en situation d'échec du traitement médical corticoïde. Toutes les analyses étaient menées après 1 mois d'arrêt de la corticothérapie locale et générale. Deux groupes de patients avec (n=47) et sans asthme (n=46) étaient comparés. Comme lors de l'étude portant sur l'objectif 1, les 2 groupes n'étaient pas différents en termes de sexe, âge, durée d'évolution de la PNS, tabagisme et sévérité de la PNS (clinique et tomodensitométrique). Le groupe de patients asthmatiques était plus souvent allergique et présentait plus souvent un antécédent de chirurgie naso-sinusienne.

II.B.2. Profil phénotypique biologique en relation avec l'asthme

En cas d'asthme associé à la PNS, l'éosinophilie sanguine et tissulaire était statistiquement augmentée. La concentration en EDN, alarmine issue de la dégranulation des EOs, était corrélée à la sévérité tomodensitométrique de la PNS selon le score de Lund-Mackay. Le taux d'EDN était plus élevé dans les sécrétions nasales en cas d'asthme associé.

Les taux d'IgE totales et d'IL-5 dans les sécrétions nasales et les taux d'IL-5 et IL-9 dans le polype étaient plus élevés en cas d'asthme associé.

II.B.3. Profil phénotypique des éosinophiles en relation avec l'asthme

Les protéines de migration tissulaire (CD11a, VLA-4) et d'interaction tissulaire (CD44) étaient moins exprimées sur les EOs du polype par comparaison aux EOs sanguins quel que soit le statut clinique des patients.

La molécule signant l'activation des EOs (CD69) était augmentée à la surface des EOs tissulaires. Le récepteur à l'IL-5 (sous unité alpha spécifique de l'IL-5) (IL-5Rα) était augmenté à la surface des EOs tissulaires. Cette expression était relativement plus faible chez les patients présentant un asthme associé à la PNS. Le récepteur à l'IL-9 (sous unité alpha

spécifique de l'IL-9) (IL-9Rα) était faiblement exprimé à la surface des EOs sanguins purifiés. Le taux d'expression de l'IL-9Rα était relativement plus élevé en cas d'asthme associé.

II.B.4. Immuno-modulation IL-5 et IL-9 dépendante et impact sur la survie des éosinophiles

Les EOs purifiés étaient mis en culture 18h en présence d'IL-5 et d'IL-9 à des concentrations déterminées lors de mises au point protocolaires antérieures.

L'expression de l'IL-5Rα n'est pas induite à la surface des EOs chez les patients asthmatiques et non asthmatiques en présence de faible concentration en IL-5 ou IL-9 (10nmol/L) par comparaison aux conditions de culture seules. A forte concentration (100nmol/L), seul l'IL-5 augmentait l'expression de l'IL-5Rα sur les EOs purifiés de patients asthmatiques. La co-incubation à faible concentration (10nmol/L) de l'IL-5 et de l'IL-9 permettait d'augmenter de manière significative l'expression de l'IL-5Rα chez les patients asthmatiques.

Cette co-incubation à faible concentration (10nmol/L) de l'IL-5 et de l'IL-9 s'accompagnait d'une diminution de taux d'apoptose à 18h des EOs mis en culture chez les patients avec un asthme associé à la PNS par comparaison à l'IL-5 seule ou à l'IL-9 seule. Cette action synergique anti-apoptotique de l'IL-5 et l'IL-9 n'était pas retrouvée chez les patients non asthmatiques.

II.C. Synthèse

L'asthme associé à la PNS se caractérise par un profil phénotypique spécifique traduisant l'importance de la réaction immunitaire Th2 et des mécanismes inflammatoires de dégranulation de l'EO à l'origine de l'œdème tissulaire.

L'éosinophilie tissulaire est favorisée par la modulation d'expression de protéines de domiciliation permettant d'une part l'extravasation vers le polype et d'autre part le maintien dans ce compartiment de l'EO par une diminution d'expression des β intégrines et du CD44.

La survie tissulaire des EOs en cas d'asthme associé est dépendante d'interactions cytokiniques IL-5/IL-9. La diminution relative d'expression de l'IL-5Rα en cas d'asthme associé observé *ex vivo* sur les EOs purifiés de polype est contrebalancée par l'action synergique de l'IL-5 et L'IL-9. Dans un environnement riche en IL-5 correspondant au profil

phénotypique d'un asthme associé, l'IL-9 pourrait concourir au recyclage membranaire de ce récepteur. De futures investigations sont nécessaires pour étayer précisemment le mécanisme d'action de l'IL-9 sur la régulation d'expression de l'IL-5Rα.

II.D. Article 2

Immune profile modulation of blood and mucosal eosinophils in nasal polyposis with concomitant asthma

Geoffrey Mortuaire, MD [*, †, ‡, §]; Isabelle Gengler, MD [*, ‡]; Claire Vandenhende-Szymanski, MD [*, ‡]; Marie Delbeke [*]; Solène Gatault, PharmD [*]; Dominique Chevalier, MD [‡]; Lionel Prin MD, PhD [†, §] and Monique Capron, PharmD, PhD [*]

[*] Inserm U995, Université de Lille, Lille, France.

[†] EA 2686, Université de Lille, Lille, France.

[‡] Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery Department, University Hospital, Lille, France.

[§] French Eosinophil Network, University Hospital, Lille, France.

ABSTRACT

Background: Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is frequently associated with asthma. Mucosal eosinophil (EO) infiltrate has been found to correlate with asthma and disease severity but not necessarily in every patient. Other multifactorial immune processes are required to determine disease endotypes and response to treatment.

Objective: To evaluate EO immunomodulation in terms of migration and survival in accordance with inflammatory proteins' profiles and asthmatic status in CRSwNP.

Methods: Ninety-three patients (47 asthmatics) with CRSwNP were included. Each patient was staged clinically according to symptom severity and polyp size. Nasal secretions were collected to establish a cytokine profile. EOs were purified from blood samples and nasal polyps to delineate specific immunophenotypes by flow cytometry and determine *in vitro* EO survival in relation with asthmatic status.

Results: CRSwNP in asthmatic patients was characterized by eosinophilia and a high level of interleukin 5 (IL-5) in nasal secretions. Although EOs exhibited activation profiles after mucosal migration, we showed a relative down-expression of IL-5 receptor α (IL-5Rα) on nasal EOs in asthmatic patients. EO culture with both IL-5 and interleukin 9 (IL-9) showed an anti-apoptotic effect in asthmatic patients through IL-5Rα modulation.

Conclusions: We assume that mucosal eosinophilia is induced by EO nasal trapping through adhesion receptors modulation. In asthmatic patients, the EO involvement is enhanced by anti-apoptotic synergistic action of T-helper 2 cytokines on IL-5Rα expression. Here, we showed for the first time that IL-9 was involved in EO homeostasis in CRSwNP and could explain the low benefit of anti-IL-5 therapy for some asthmatic patients with nasal polyposis.

Key words: eosinophil, interleukin 5, interleukin 9, adhesion, apoptosis, endotype

Introduction

Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a clinical syndrome characterized by persistent symptomatic inflammation of the mucosa of the nose and paranasal sinuses. It affects 1 to 4.3% of the general population.[1-3] The impact of the disease on quality of life is major with chronic nasal obstruction and dysosmia.[4] Functional endoscopic sinus surgery (FESS) is required when symptoms persist despite optimal medical treatment, which is still based on topical and systemic corticosteroid.[3, 5] Medical failure is mainly observed in concomitant asthma or acetylsalicylic acid (ASA) intolerance, which represent respectively 42% and 15% of the patients.[6-10] Similarly, asthma associated with CRSwNP frequently accounts for patients with substantial residual disease in spite of contemporary airway treatment approaches.[3]

The pathogenesis of CRSwNP is still poorly understood, given that this syndrome encompasses major variants or endotypes. The impact of allergy known as an excessive inflammation driven by aberrant T-helper 2 (Th2) immunity is controversial as allergy incidences in CRSwNP and the general population are equal.[3] Environmental factors such as fungal *(Alternaria*) or bacterial *(Staphylococcus aureus)* agents could act as trigger factors of nasal mucosa disruption and stromal inflammation through innate and adaptive immune responses.[11-13] Whatever the hypotheses, the characteristic of CRSwNP inflammation in the Caucasian population is major eosinophil (EO) mucosal infiltrate.[14-18]

Nasal infiltrate requires active blood EO recruitment and EO survival within the mucosa after trans-endothelial migration. Adhesion agents are described as pivotal in EO interaction with nasal vessels and mucosal extracellular matrix components.[19, 20] Many of them, such as CD44, lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1 or CD11a/CD18) β2 integrin or very late antigen-4 (VLA-4 or CD49b/CD29) β1 integrin have been studied in airway inflammation.[21-23] The expression modulation of these interacting and homing receptors and their role in asthmatic and non-asthmatic CRSwNP patients still require further investigations.

Concerning EO priming within mucosa, many studies emphasize the major role of pro-inflammatory cytokines via the epithelial thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-dependent signaling pathway and innate lymphoid cell activation.[24-26] Interleukin 5 (IL-5), mainly produced by activated T cells, mast cells and EOs, is associated with the clinical severity of asthma.[27] In CRSwNP, high levels of IL-5 in nasal polyps have been proved to be associated with comorbid asthma.[28] Even though anti-IL-5 therapies with mepolizumab or reslizumab are effective to improve quality of life scores and reduce exacerbations rates and blood and sputum EO counts in asthma, [29] only short term efficacy has been observed on symptoms and

polyp eosinophilia in patients with severe nasal polyposis.[30-33] Among other cytokines produced by T cells and EOs, interleukin 9 (IL-9) has also been studied in lower airway inflammation and has been shown to be involved in blood EO maturation and survival by enhancing IL-5 receptor α (IL-5Rα) membrane expression. Its interaction with IL-5 in CRSwNP has not yet been clearly evaluated.[34]

To further investigate the relationship between asthma and CRSwNP in terms of EO involvement and disease variants, we first compared patients in terms of eosinophilia and levels of pro-inflammatory markers in blood samples and nasal secretions. Subsequently, we examined EO profiles in terms of adhesion and interleukin receptor expression. In patients with both CRSwNP and asthma, we delineated a specific inflammatory endotype and demonstrated potential additive effects of IL-5 and IL-9 on EO survival.

Methods

Patients

Ninety-three subjects aged more than 18 years with CRSwNP (according to the European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps guidelines[3]) were included. All patients provided written informed consent before participation. Moreover, the study on EOs sample collection was approved by local ethics review board (registration number: 2009-A00314-53). The patients were initially referred to our department for persistent symptoms despite optimal medical treatment (at least 3 courses of 7-day oral corticosteroid and maximum dose of topical nasal corticosteroid spray). Concomitant asthma (diagnosed by spirometry), allergy (confirmed with skin prick testing) and history of ASA intolerance were assessed. Patients were enrolled after maximum medical management failure and FESS indication. Patients with immunodeficiency, autoimmune disease and/or cystic fibrosis were excluded.

The burden of sinonasal symptoms was measured by visual analogical scale (VAS) with 0 = no symptom. The polyp size was endoscopically measured using a 30-degree rigid nasal fiberoptic scope according to the Lildholdt grading system (maximum total score: 3).[35] A computed tomography (CT) scan was performed to evaluate sinus opacifications by the Lund-Mackay scoring system (maximum total score: 24).[36]

Two groups were systematically compared: asthmatic patients (n=47) and non-asthmatic patients (n=46) (Table 1). These 2 groups were comparable for age, gender, duration of CRSwNP before surgery in our institution and tobacco use. In terms of severity,

mean VAS, polyp score and CT scan opacification staging were not different in the two groups of patients. However, prior surgery (p=0.036) and allergy (p=0.027) were more frequent in asthmatic patients.

Samples collection

The samples collected from our 93 patients were used for cytokine measurement, EO purification and/or histopathologic analysis.

To improve the homogeneity of the population, any kind of medical therapy (oral and topical corticosteroid) except nasal douching with saline solution was stopped at least 1 month before surgery. Blood samples for EO count and EO purification were obtained 3 weeks before surgery on BD Vacutainer™ EDTA tubes (BD medical, Franklin Lakes, NJ). Nasal secretions were collected during the surgical procedure. Two surgical patties 1.27 cm×2.54 cm (Codman, Raynham, MA) were placed in each nasal fossa for 5 min. Patties were put in 3 mL of phosphate-buffered saline (PBS) and stored for 1 h at 4°C. Nasal fluid was centrifuged at 1400 rotations per min (rpm) for 8 min to separate the cellular components. Thereafter, supernatants were portioned according to Bradford assay for protein concentration and stored at -70°C until cytokine determination. Nasal polyps were obtained at the beginning of the surgical procedure. Through endoscopic view, one polyp was gently removed for each patient and kept for a maximum of 1 h at room temperature (RT) in sterile saline before further procedures.

EO purification from blood sample

EOs were isolated as previously described[37] on Percoll gradient (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) followed by a negative immunomagnetic selection using anti-CD16-, anti-CD2- and anti-CD14- coated microbeads on a Cs column (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for 30 min at 4°C. Purity was determined on cytospin preparations after RAL 555 staining and was above 98%.

EO purification from nasal polyp

The protocol was adapted from a previously published procedure.[38] Piecemeal tissue was submitted to a first mechanical dissociation with a GentleMacs dissociator™ (Miltenyi Biotec). The fragments were subsequently digested by incubation for 1h at 37°C with collagenase type-II (2mg/g tissue) and Dnase I (80µg/g tissue) (Invitrogen, Carlsbad, CA) in culture medium RPMI 1640 without phenol red (supplemented with 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate, and 10 µg/ml gentamycin), hereafter referred to as complete medium (CM). A second mechanical

dissociation was performed and thereafter the digested tissue was filtered through a 300- µm and a 70- µm nylon mesh with PBS. Cell viability was determined on cytospin preparations after RAL 555 staining and was above 75%. Following a negative selection procedure, cells were incubated with anti-CD326-, anti-CD105-, anti-CD2- conjugated magnetic beads (Miltenyi Biotec) and an Eosinophil isolation kit™ (Miltenyi Biotec) for 30 min at 4°C with gentle tilting. The mixture was layered onto a steel wire column (MACS LD column™) (Miltenyi Biotec). The column was then washed and the eluted $CD236^-$ $CD105^-$ $CD2^-$ eosinophils were collected in PBS, 0.5% BSA, 2mM EDTA. Cell purity was measured using a Countess™ automated cell counter (Invitrogen) and was above 80%. Mean EO purification yield was 48%.

EO culture procedure

A part of the purified EOs from blood was incubated at 37°C in 5% CO_2 in CM with IL-5, IL-9 or eotaxin (Peprotech, Rocky Hill, NJ). The best time to study receptor profile modulation and apoptosis in purified EO culture (18 hours) was determined by preliminary procedures.

Flow cytometry

EO membrane staining:

Antibodies and isotype controls used for flow cytometry (origin, clone) are listed online in eTable 1. Samples were analysed on BD Accuri™ C6 cytometer and software (BD biosciences, San Jose, CA). At least 10^4 events were acquired per sample.

Membrane staining of EOs (2×10^5 cells for each condition) was performed in PBS, 0.5% BSA after blocking of non-specific binding with 5 µl mouse serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 20 min. Cells were incubated with FITC-antibodies or FITC-control isotype antibodies for 25 min in the dark. For IL-9 receptor α (IL-9Rα) staining, a primary goat biotin-conjugated antibody (SouthernBiotech, Birmingham, AL) was used. Non-specific binding was avoided with 10 µl goat serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), and a subsequent step of incubation with FITC-streptavidin (RαD system, Minneapolis, MN) for 20 min was required. After washing in PBS, cells were submitted to C6Flow™ analysis.

To improve the accuracy of cell targeting, a double staining was used for analysis of purified EOs from nasal polyps. After labelling for membrane receptor with the relevant fluorochrome-conjugated antibodies for 25 min and washing in PBS, EOs were fixed 10 min with 2% paraformaldehyde (ThermoScientific, Waltham, MA) at 4°C and permeabilized for 10 min at RT with 0.01% saponin (Sigma-Aldrich) in PBS-1% BSA. Non-specific binding

was blocked with 5µl mouse serum for 10 min. Purified EOs were further identified by incubation with biotinylated anti-EPO or isotype control for 30 min and streptavidin-PE (Molecular Probes, Eugene, OR) (1:500) for 20 min in the presence of saponin.

EO apoptosis:

EOs (1×10^5 for each condition) were incubated on U-bottom plates at 37°C in 5% CO_2 in CM for 18 hours without stimulation (medium alone), with IL-5 (10nM, 100nM), IL-9 (1nM, 10nM, 100nM), eotaxin (100nM) or with both IL-5 (10nM) and IL-9 (10nM) (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Apoptosis was measured after AnnexinV-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA) staining for 15 min at RT in the dark. Analysis was performed on a BD Accuri™ C6 cytometer and software (BD biosciences).

IL-5Rα membrane expression modulation on EOs:

EOs (4×10^5 for each condition) were incubated with the same conditions and IL-5Rα membrane staining was performed as described above.

Protein assays

Stored nasal secretions and snap frozen polyps were used. Polyps were submitted to mechanical dissociation with a GentleMacs dissociator™ (Miltenyi Biotec). After centrifugation at 4000 rpm, nasal polyp supernatants were collected. EDN (eosinophil-derived neurotoxin), IL-5 and IL-9 levels were measured by specific ELISA kits from MBL International (Nagoya, Japan), RαD system (Minneapolis, MN) and Bio-Rad (Hercules, CA). The lower detection limit was 0.62 ng/ml for EDN, 0.29 pg/ml for IL-5 and 2.5 pg/ml for IL-9. Total IgE levels were measured by Phadia™ immunoCAP test (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Analyses were performed on purified blood EOs and nasal polyp sections. Detailed protocols are available online (see eMethods).

Statistical analyses

Data were input into Microsoft Excel™ and statistical analysis was performed with SPSS™ v 15.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL). Means and standard deviations (SD) were reported for descriptive statistics. The Chi-squared test was used for comparison of demographic data. The non-parametric Wilcoxon test was used to compare the means of paired samples. The non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare the means of non-paired samples. Correlation analyses were conducted with the

Pearson test (using *rho* as correlation coefficient). A two-tailed p-value ≤0.05 was considered statistically significant.

Results

Inflammatory profiles of CRSwNP patients in relation to asthma

Eosinophilia and EDN as characteristics of asthmatic patients (Figure 1)

Blood samples (n=55) and nasal polyps (n=31) were collected for EO counting before cell purification. In asthmatic patients, there were more EOs in the blood compartment (asthma: 759±120 cells/mm^3, without (w/o) asthma: 376±48 cells/mm^3; p<0.01) (Figure 1A). The rate of EOs in mucosa after polyp dissociation was higher in asthmatic patients by comparison with others types of inflammatory cells (asthma: 21±3.5 %, w/o asthma: 8.8±3 %; p<0.01) (Figure 1B). Nasal secretions were collected from asthmatic patients (n=20) and non-asthmatic patients (n=18). EDN, a cationic protein described as an alarmin present in EO granules, was also increased in asthmatic patients (asthma: 489±118 ng/ml, w/o asthma: 200±21 ng/ml; p<0.05) (Figure 1C). For the overall population, there was a positive correlation between EDN secretion levels and CT scan score (*rho*=0.47, p<0.01) (Figure 1D).

IL-5, IL-9 and IgE as markers of Th2 polarization in asthmatic patients (Figure 2)

Nasal secretions were collected from asthmatic patients (n=20 or 21) and non-asthmatic patients (n=12). In asthmatic patients, IL-5 (asthma: 37.5±9 pg/ml, w/o asthma: 12±4.7 pg/ml; p<0.05) (Figure 2A) and IgE (asthma: 63±24.5 KUI/ml, w/o asthma: 26.5±12.3 KUI/ml; p<0.02) (Figure 2B) were statistically more expressed in nasal secretions. For the overall population, there was a positive correlation between IgE and IL-5 secretion levels (*rho*=0.41, p<0.05) (Figure 2C). More elevated levels of IL-5 (data not shown) and IL-9 (Figure 2D) were observed in polyps collected from asthmatic patients.

Main phenotype features in blood and polyp purified EOs

EO adhesion marker modulations from blood to mucosal compartments (Figure 3)

The expression of β integrins (VLA-4, CD11a) and CD44 by EOs purified from blood samples (n=19) and nasal polyps (n=20) of patients with CRSwNP was studied by flow cytometry. Data represent median channel fluorescence for each marker. β2 integrin (CD11a) was more expressed than β1 integrin (VLA-4). A significantly decreased expression of VLA-4 (blood: 52.5±5; polyp: 32.8±7) and CD11a (blood: 517.3±37.1; polyp: 299±26.7) was observed between blood and nasal EOs (p<0.05). CD44 was also reduced on EO membrane in

nasal polyps ($p<0.001$). This down-expression of proteins involved in cell migration and interaction was observed both in asthmatic and non-asthmatic patients.

EO activation and survival receptor modulations from blood to mucosal compartments (Figure 4 and eFigure 1)

The expression of CD69 and IL-5Rα by EOs purified from blood samples (n=19) and nasal polyps (n =20) of patients with CRSwNP was studied by flow cytometry (Figure 4). Data represent median channel fluorescence for CD69 and percentage of EOs positive for IL-5Rα. CD69 was significantly up-regulated on nasal EOs in both asthmatic and non-asthmatic patients (blood: 13.3±5.5; polyp: 59.5±15; $p<0.05$). The IL-5Rα membrane expression rate was low but was slightly increased in nasal EO (blood: 2.1±0.3; polyp: 6.4±0.7; $p<0.001$). There was a significant discrepancy between asthmatic and non-asthmatic patients. IL-5Rα was less expressed on EO membrane in nasal polyps for asthmatic patients ($p<0.05$). No difference was observed for IL-5Rα expression on EOs collected from blood samples of the two types of patients.

In order to corroborate CD69 and IL-5Rα presence on EOs from both compartments, qualitative immunohistochemical and immunofluorescence analyses were performed. Further details are available online (see eResults and eFigure 1).

The expression of IL-9Rα by EOs purified from blood samples of asthmatic (n=7) and non-asthmatic (n=6) patients was determined by flow cytometry. IL-9Rα was more expressed on blood EOs from asthmatic patients (asthma: 4.4±0.9 %, w/o asthma: 1.7±0.9%; $p<0.05$) (data not shown).

Impact of IL-5 and IL-9 on IL-5Rα expression and EO survival in CRSwNP patients with asthma

In vitro IL-5Rα membrane expression is upregulated in EOs of asthmatic patients in the presence of IL-5 and IL-9 (Figure 5)

Purified blood EOs from blood samples of asthmatic (n=7) and non-asthmatic patients (n=5) with CRSwNP were analysed. Data represent the mean percentage of EOs positive for IL-5Rα. By comparison with non-stimulated cells, IL-5 (10 nM), IL-9 (10 nM) or eotaxin (100 nM) did not induce IL-5Rα expression by EOs of either asthmatic or non-asthmatic patients. IL-5 (100 nM) increased IL-5Rα expression in asthmatic patients (15.3±9 %) when compared with the other conditions, in particular IL-5 (10 nM) (8.9±1.4 %) though without reaching statistical significance. Co-incubation with IL-5 (10 nM) and IL-9 (10 nM) raised

significantly the level of IL-5Rα expression in EOs of asthmatic patients (19.6±11 %) by comparison with the medium alone (12.9±4 %) ($p<0.05$).

In vitro EO apoptosis is reduced in asthmatic patients in the presence of IL-5 and IL-9 (Figure 6)

We assessed the role of IL-5 and IL-9 in EO survival. Apoptosis was studied by flow cytometric analysis on purified EO from blood samples of non-asthmatic (n=5) and asthmatic patients (n=5) with CRSwNP. Data represent the mean percentage of EOs positive for annexin V. By comparison with non-stimulated cells, EO apoptosis was decreased significantly in the presence of IL-5 in a concentration-dependent manner ($p<0.05$) or in the presence of IL-5 and IL-9 ($p=0.01$) in both asthmatic and non-asthmatic patients. IL-9 alone did not modify EO apoptosis whatever the concentration. Eotaxin had no influence on EO apoptosis. Co-incubation with IL-5 (10 nM) and IL-9 (10 nM) showed a decrease in EO apoptosis mean rate (31±9.5 %) compared with IL-5 (10 nM) alone (46±19.7 %) in asthmatic patients (black bar), without reaching statistical significance.

Discussion

In this report, we show that eosinophilia, known as a major characteristic of CRSwNP, is mediated by modulation of EO recruitment and survival factors. Adhesion receptor expression is modulated to favour EO migration to and trapping into the polyps. Our data show that a relative IL-5Rα/IL-5 interaction down-regulation in asthmatic patients might be thwarted by IL-9/IL-5 enhancement of IL-5Rα expression.

In Caucasians, comorbid asthma is a well-described factor of CRSwNP severity.[8, 9] Patients with CRSwNP and asthma have a poor medical and surgical response with a high recurrence rate.[30] Thus, we noticed more patients with prior surgical procedures in the asthmatic group in our study. Allergy was also more prevalent in this group. Although allergy is not clearly recognized as an etiologic factor in CRSwNP, its occurrence increases the disease burden.[3]

In most of the cases, CRSwNP is characterized by a prominent local eosinophilic inflammation with a high production of eosinophil cationic proteins, IL-5 and tissue IgE.[12, 39] In the spectrum of CRS diseases, those proteins have been cited as useful biological landmarks to delineate different endotypes.[40] In our study, we noticed that high expression levels of EDN, IgE, IL-5 along with blood and mucosal eosinophilia in CRSwNP patients could be virtually associated with comorbid asthma. Notably, these findings are unrelated to allergy diagnosed on skin prick tests (data not shown). With a positive correlation observed

between IL-5 and IgE rates in our analysis, we corroborate recent evidence suggesting that local induction of polyclonal IgE formation is combined with severe eosinophilic local inflammation.[41] Furthermore, involvement of EO degranulation in tissue remodeling is supported in our study by a positive correlation between EDN levels in nasal secretions and CT scan score. EDN, known as an alarmin, is involved in Th2 polarized immune response.[42]

Persistent mucosal eosinophilia requires both blood EO recruitment and survival within the mucosa. Here, we have shown that EO migration into nasal polyps is associated with β integrins and CD44 down-expression in both asthmatic and non-asthmatic patients. As with other leukocytes, CD44 may be a primary adhesion molecule required for EO migration.[43] In asthma, VLA-4 also appears to be involved in the initial adherence of activated EOs, when the cells slow down in the blood stream.[22] We assume that, after a priming useful for EO migration, CD44 and VLA-4 functions are reduced when EO mucosal migration is achieved. Another explanation could be a conversion of these proteins into a low avidity state in the polyp,[22] reducing their interaction with specific antibodies used for cytometric analyses. We showed that β_2 integrin LFA-1 (CD11a) was more expressed than β_1 integrin VLA-4 on blood EOs. As IL-5 is responsible for up-regulation of β_2 integrins on circulating EOs in asthma,[44] we postulate that LFA-1 is also up-regulated on blood EOs in CRSwNP. LFA-1 is implicated in EO extravasation and can also exist in bent, inactive conformations.[44] As is the case with CD44 and VLA-4, LFA-1 low expression levels in polyps could also be related to EO mucosal trapping. Ultimately, our results suggest that adhesion proteins have different levels of expression according to EO location in extra- or intra-tissular spaces.

We have shown using cytometry and immunohistochemistry that EOs in the polyps are activated (CD69+) and expressed IL-5Rα and IL-9Rα in both asthmatic and non-asthmatic patients. Such a result excludes the hypothesis of a possible EO membrane alteration through a purification protocol as might be postulated for adhesion receptor down-expression. IL-5 plays a critical role in the life span of EOs by contributing to their activation state and by protecting them from apoptosis.[45] We have observed that EO apoptosis was reduced in a concentration-dependent manner with IL-5 after 18h-incubation, by comparison with unstimulated EOs, in both asthmatic and non-asthmatic patients. Paradoxically, we observed a relative reduction of IL-5Rα expression on mucosal EOs in asthmatic patients. This result corroborates previous observations of a differential expression of IL-5Rα isoforms in patients with asthma or nasal polyposis.[33, 46, 47] Gevaert et al. showed that exposure of EOs to IL-5 reduced their responsiveness to IL-5 by down-regulation of the membrane IL-5Rα.[45] Liu et al. observed a similar result after allergen challenge of asthmatic patients with EOs collected

from bronchoalveolar lavage.[46] The authors assumed that metalloproteinase-mediated receptor cleavage[47] or mobilization-internalization processes[48] could be involved in an IL-5 dependent manner. We noticed on immunofluorescence polyp section analyses that a positive staining for IL-5Rα was present in the stromal compartment. We postulate that a steady state of IL-5Rα recycling and cleavage on EO membrane could corroborate both published data and our findings. In this perspective, it was pertinent to evaluate a potent local effect of IL-9 on IL-5Rα regulation.

We demonstrate that IL-9Rα was more expressed (asthma: 4.4±0.9 %, w/o asthma: 1.7±0.9%; $p<0.05$) on purified EOs of asthmatic patients. IL-9 has been described as a Th2 anti-apoptotic cytokine on T cells lines[49] and as a factor of EO maturation in asthmatic patients.[50] As such, despite similar concentrations of IL-9 in polyps of both groups of patients, reactivity to this cytokine might favour EO persistence in CRSwNP in an IL-5 dependent manner. Our data show that IL-9 alone did not impact on EO survival. In contrast, as previously described in asthma[50], the supplementation of IL-5 with IL-9 sustained the anti-apoptotic effect on EO compared to IL-5 alone. Moreover, we showed that co-incubation with IL-5 and IL-9 increased IL-5Rα expression on EOs in asthmatic patients. The synergistic action of IL-5 and IL-9 is corroborated by published data on induced eosinophilia in IL-9 transgenic mice.[51] Produced by EO itself [34], IL-9 could also enhance this potential additive interaction by an autocrine process. In concomitant asthmatic and CRSwNP patients characterized by high IL-5 levels in nasal polyps, IL-9 could refine IL-5/IL-5Rα interactions by promoting IL-5Rα expression on EO membrane. Eotaxin, known to be an important activator of EOs[52], had no effect on EO apoptosis and IL-5Rα expression in our study. We assume that eotaxin activity could require environmental cofactors that were absent in our *in vitro* culture conditions.

Ultimately, we believe that a functional redundancy exists among Th2 cytokines to allow persistent and severe disease in asthmatic patients with CRSwNP. Down-regulation of IL-5Rα on EO membrane seems to be offset by IL-9 promotion of IL-5Rα expression. Taken together, our results suggest that eosinophilia in CRSwNP is achieved partly by modulation of adhesion agents on EO membrane. With concomitant asthma, intricate Th2 cytokine involvement in EO survival could contribute to a specific inflammatory endotype. This new insight needs to be corroborated by *in vivo* models in order to confirm the potential impact of IL-5 and IL-9 co-targeting in new therapeutic approaches.

Taken all together, our results indicate that mucosal eosinophilia in CRSwNP requires a combination of recruitment and survival processes whose modulations can be observed between asthmatic and non-asthmatic patients. With a specific approach of cell purification, we showed that blood EO homing into the nose and Th2 cytokine crosstalk are cornerstones of CRSwNP inflammation in asthmatic patients.

For the first time in nasal polyposis, our results point to an involvement of IL-9 in EO survival, especially in asthmatic patients. Understanding the mechanisms of IL-9- dependent IL-5Rα up-regulation on EO surface needs further investigations.

Future targeted immune therapies for patients with medically and surgically resistant CRSwNP will have to consider simultaneously these intricated inflammatory pathways.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ms Virginie Lefèvre (EA2686) and Dr Bénédicte Vanteghem, PhD (EA2686) for their expert technical assistance in data collection and Dr Lennart T. Mars, PhD (U995) for proof reading of the manuscript.

This work was supported by grants from ARO foundation (Otology Research Association, Place de Verdun, Lille, France) and Inserm (French National Institutes for Health and Medical Research).

References

1. Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. Int J Epidemiol. 1999;28:717-722.

2. Hosemann W, Göde U, Wagner W. Epidemiology, pathophysiology of nasal polyposis, and spectrum of endonasal sinus surgery. Am J Otolaryngol. 1994;15:85-98.

3. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. Rhinology 2012; 23 (suppl 3) :S1-S298.

4. 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. 2010;127:91-96.

5. Mortuaire G, Bahij J, Maetz B, Chevalier D. Lund-Mackay score is predictive of bleeding in ethmoidectomy for nasal polyposis. Rhinology. 2008;46:285-288.

6. Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, et al. Prevalence of nasal polyposis in France: A crosssectional, case-control study. Allergy. 2005;60:233-237.

7. Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. Allergy Asthma Proc. 1996;17:231-236.

8. Matsuwaki Y, Ookushi T, Asaka D, et al. Chronic rhinosinusitis: risk factors for the recurrence of chronic rhinosinusitis based on 5-year follow-up after endoscopic sinus surgery. Int Arch Allergy Immunol. 2008;146 (suppl 1):S77-S81.

9. Mendelsohn D, Jeremic G, Wright ED, Rotenberg BW. Revision rates after endoscopic sinus surgery: a recurrence analysis. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2011;120:162-166.

10. Zhang Z, Linkin DR, Finkelman BS, et al. Asthma and biofilm-forming bacteria are independently associated with revision sinus surgeries for chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2011;128:221- 223 .

11. Sasama J, Sherris DA, Shin SH, Kephart GM, Kern EB, Ponikau JU. New paradigm for the roles of fungi and eosinophils in chronic rhinosinusitis. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2005;13:2-8.

12. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2001;107:607-614.

13. Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2008;8:34-38.

14. Roongrotwattanasiri K, Pawankar R, Kimura S, Mori S, Nonaka M, Yagi T. Decreased Expression of FOXP3 in Nasal Polyposis. Allergy Asthma Immunol Res. 2012;4:24-30.

15. Kim YM, Munoz A, Hwang PH, Nadeau KC. Migration of regulatory T cells toward airway epithelial cells is impaired in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. Clin Immunol. 2010;137:111-121.

16. Kato A, Peters A, Suh L, et al. Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2008;121:1385-1392.

17. Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, Cuvelier C, Cauwenberge P, Bachert C. Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to Staphylococcus aureus enterotoxins in nasal polyp tissue. Allergy. 2005;60:71-79.

18. Tieu DD, Kern RC, Schleimer RP. Alterations in epithelial barrier function and host defense responses in chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2009;124:37- 42.

19. Van Bruaene N, Bacher t C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2011;11:8-11.

20. Beck LA, Stellato C, Beall LD, et al. Detection of the chemokine RANTES and endothelial adhesion molecules in nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 1996;98:766-780.

21. Sano K, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Tamura G, Shirato K. CD44 expression on blood eosinophils is a novel marker of bronchial asthma. Int Arch Allergy Immunol. 1997;114(suppl 1):67-71.

22. Lantero S, Alessandri G, Spallarossa D, Scarso L, Rossi GA. LFA-1 expression by blood eosinophils is increased in atopic asthmatic children and is involved in eosinophil locomotion. Eur Respir J. 1998 Nov;12:1094-1098.

23. Jahnsen FL, Haraldsen G, Aanesen JP, Haye R, Brandtzaeg P. Eosinophil infiltration is related to increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 in nasal polyps. Am J Respir Cell Mol Biol. 1995;12:624-632.

24. Lamblin C, Bolard F, Gosset P, et al. Bronchial interleukin-5 and eotaxin expression in nasal polyposis. Relationship with (a)symptomatic bronchial hyperresponsiveness. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163:1226-1232.

25. Nagarkar DR, Poposki JA, Tan BK, et al. Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2013;132:593-600.

26. Miljkovic D, Bassiouni A, Cooksley C, et al. Association between Group 2 Innate Lymphoid Cells enrichment, nasal polyps and allergy in Chronic Rhinosinusitis. Allergy. 2014 ;69:1154-1161.

27. Humbert M, Corrigan CJ, Kimmitt P, Till SJ, Kay AB, Durham SR. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156:704-708.

28. Bachert C, Zhang N, Holtappels G, et al. Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. J Allergy Clin Immunol. 2010;126:962-968.

29. Flood-Page P, Swenson C, Faiferman I, et al. International Mepolizumab Study Group. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176:1062-1071.

30. Gevaert P, Calus L, Van Zele T, et al. Omalizumab is effective in allergic and non-allergic patients with nasal polyps and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2013;131:110-116.

31. Gevaert P, Lang-Loidolt D, Lackner A, et al. Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2006;118:1133-1141.

32. Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, et al. Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol. 2011;128:989-995.

33. Gevaert P, Bachert C. Differential expression of the interleukin 5 receptor alpha isoforms in blood and tissue eosinophils of nasal polyp patients. Allergy. 2009;64:725-732.

34. Shimbara A, Christodoulopoulos P, Soussi-Gounni A, et al. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2000;105:108-115.

35. Lildholdt T, Fogstrup J, Gammelgaard N, Kortholm B, Ulsoe C. Surgical versus medical treatment of nasal polyps. Acta Otolaryngol. 1988;105:140-143.

36. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitus. Rhinology. 1993;31:183-184.

37. Legrand F, Driss V, Delbeke M, et al. Human eosinophils exert TNF-α and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. J Immunol. 2010;185:7443-7451.

38. Ben Efraim AHN, Munitz A, Sherman Y, Mazer BD, Levi-Schaffer F, Eliashar R. Efficient purification of eosinophils from human tissues: a comparative study. J. Immunol. Methods. 2009;343:91–96.

39. Lamblin C, Gosset P, Salez F, et al. Eosinophilic airway inflammation in nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:85-92

40 Akdis CA, Bachert C, Cingi C, et al. 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. J Allergy Clin Immunol. 2013;131:1479-1490.

41. Van Zele T, Gevaert P, Watelet JB, et al. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol. 2004 ;114:981-983.

42. Yang D, Chen Q, Su SB, et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. J Exp Med. 2008 ;205:79-90.

43. Siegelman MH, Stanescu D, Estess P. The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. J Clin Invest. 2000 ;105:683-691.

44. Johansson MW, Gunderson KA, Kelly EA, Denlinger LC, Jarjour NN, Mosher DF. Anti-IL-5 attenuates activation and surface density of β(2) -integrins on circulating eosinophils after segmental antigen challenge. Clin Exp Allergy. 2013 ;43:292-303.

45. Gevaert P, Hellman C, Lundblad L, et al. Differential expression of the interleukin 5 receptor alpha isoforms in blood and tissue eosinophils of nasal polyp patients. Allergy. 2009;64:725-732.

46. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, et al. Decreased expression of membrane IL-5 receptor alpha on human eosinophils: I. Loss of membrane IL-5 receptor alpha on airway eosinophils and increased soluble IL-5 receptor alpha in the airway after allergen challenge. J Immunol. 2002;169:6452-6458.

47. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, et al. Decreased expression of membrane IL-5 receptor alpha on human eosinophils: II. IL-5 down-modulates its receptor via a proteinase-mediated process. J Immunol. 2002;169:6459-6466.

48. Gregory B, Kirchem A, Phipps S, et al. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. J Immunol. 2003;170:5359-5366.

49. Renauld JC, Vink A, Louahed J, Van Snick J. Interleukin-9 is a major anti-apoptotic factor for thymic lymphomas. Blood. 1995;85:1300-1305.

50. Gounni AS, Gregory B, Nutku E, et al. Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. Blood. 2000;96:2163-2171.

51 Louahed J, Zhou Y, Maloy WL, et al. Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils. Blood. 2001;97:1035-1042.

52. Yao T, Kojima Y, Koyanagi A, et al. Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. Laryngoscope. 2009;119:1053-1059.

Tables

Table 1. Demographic and clinical description of the study population.

	Asthma	W/o asthma	*p*-value
Population (n=93)	47	46	ns
Mean age (years)	49.5	46.6	ns
Sex ratio	31M/16F	36M/10F	ns
Duration of CRSwNP (years)	12.4	10.4	ns
Prior surgery (%)	53.2	30.4	0.036*
Allergy (%)	44.7	21.7	0.027*
ASA intolerance (pts)	14	-	-
Tobacco use (n=9)	2	7	ns
Mean polyp size score (/3)	2.47	2.38	ns
Mean CT scan score (/24)	19.09	19.15	ns
Mean VAS score (/10)	7.3	7.1	ns

*Chi-squared test

CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; CT, computed tomography; F, female; M, male; ns, non-significant; pts, patients; VAS, visual analogical scale; W/o, without.

Figures

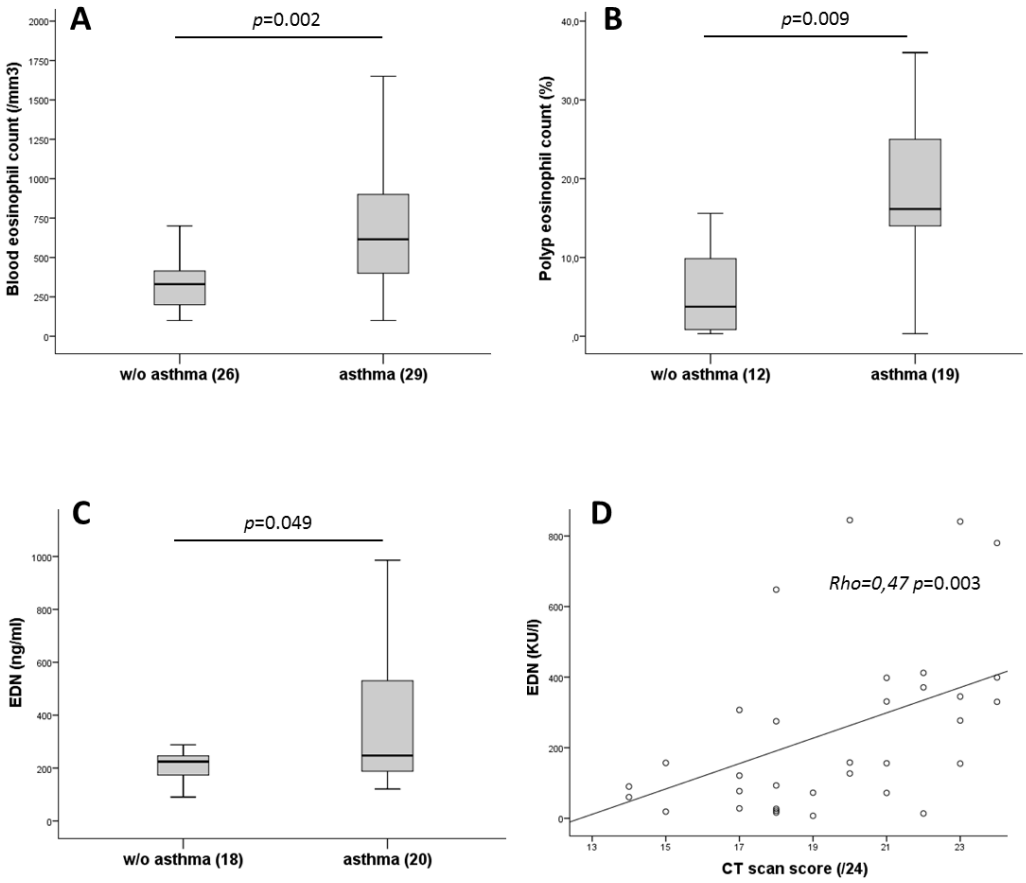


Figure 1. Eosinophilia and EDN as inflammatory markers in CRSwNP patients with asthma.

For each sample (A-B), EO counting was performed before cell purification. EDN was increased in asthmatic patients (C) and correlated to CT scan score (D).

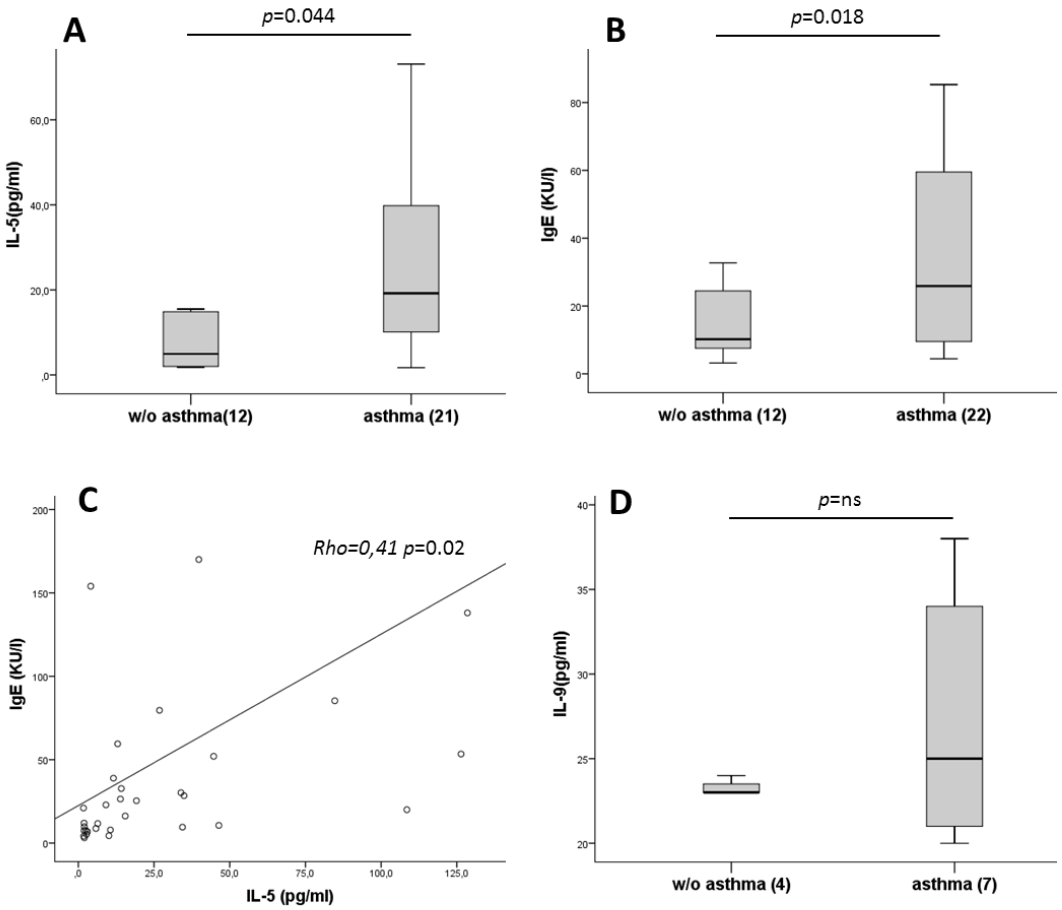


Figure 2. Inflammatory profile of CRSwNP patients with Th2 polarisation in asthmatic patients.

IL-5 (A), and IgE (B) nasal secretion levels were increased and correlated in asthmatic patients (C). IL-9 level was increased in polyps of asthmatic patients (D).

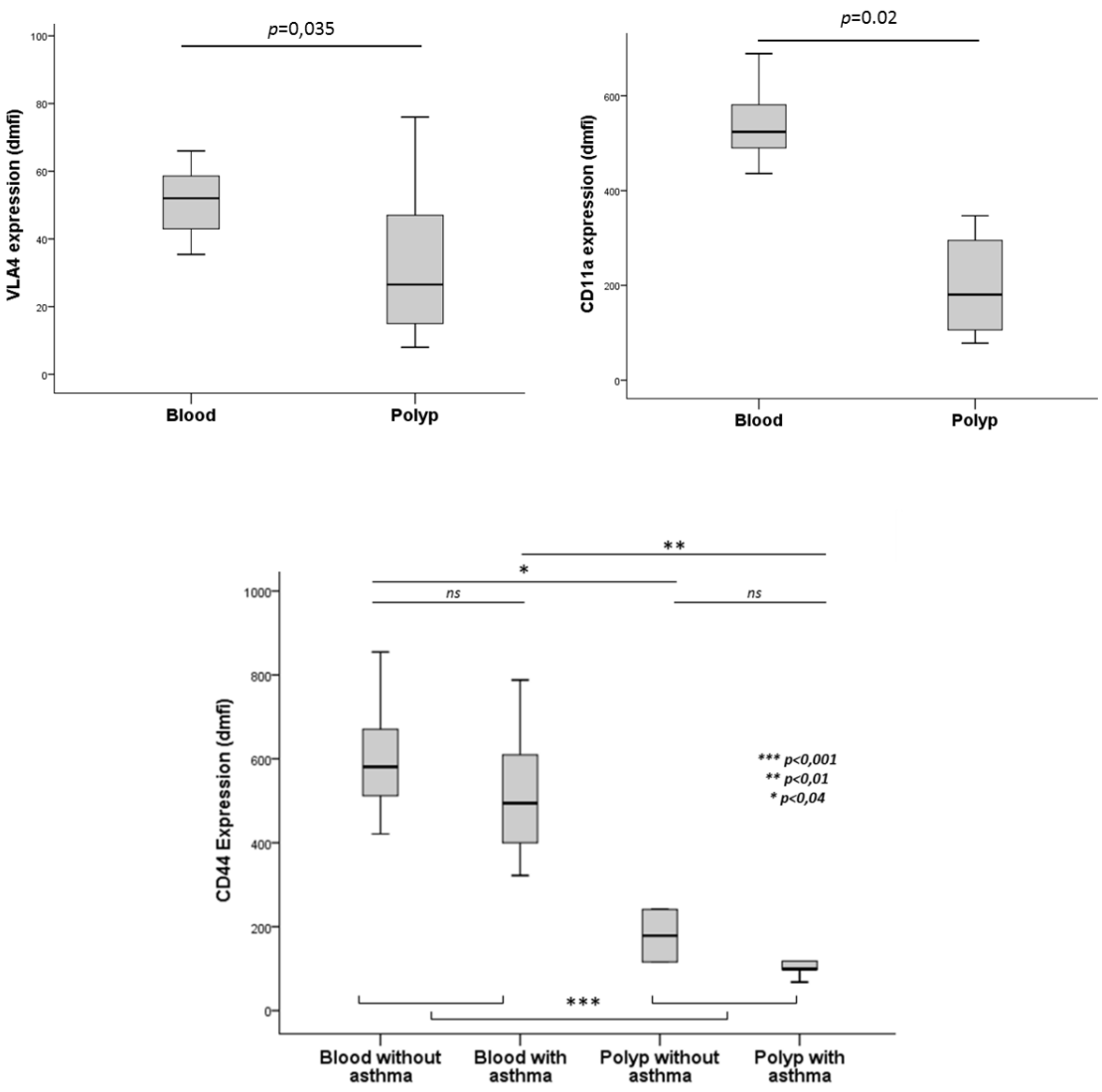


Figure 3. Adhesion receptor modulation in EOs between the blood (n=19) and the nasal mucosa (n =20) compartments.

VLA-4, CD11a and CD44 expression were decreased in nasal EOs. There was no difference between asthmatic and non-asthmatic patients for β integrin (data not shown) and CD44 expression within each compartment.

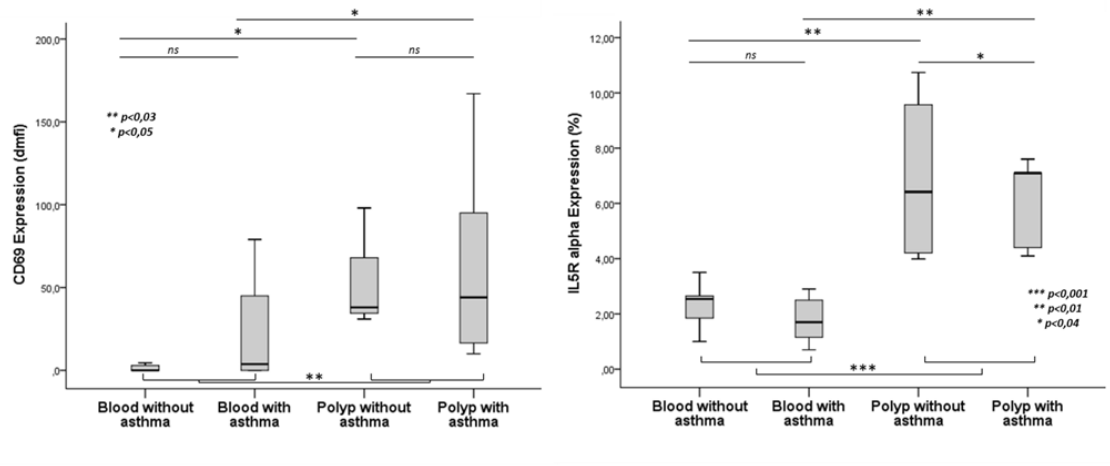


Figure 4. CD69 activation marker and IL-5 receptor alpha modulation in EOs between the blood (n=19) and the nasal mucosa (n=20) compartments.

CD69 and IL-5Rα were up-regulated in nasal EOs in both asthmatic and non-asthmatic patients. IL-5Rα was less expressed in nasal polyps of asthmatic patients. No difference was observed within each compartment.

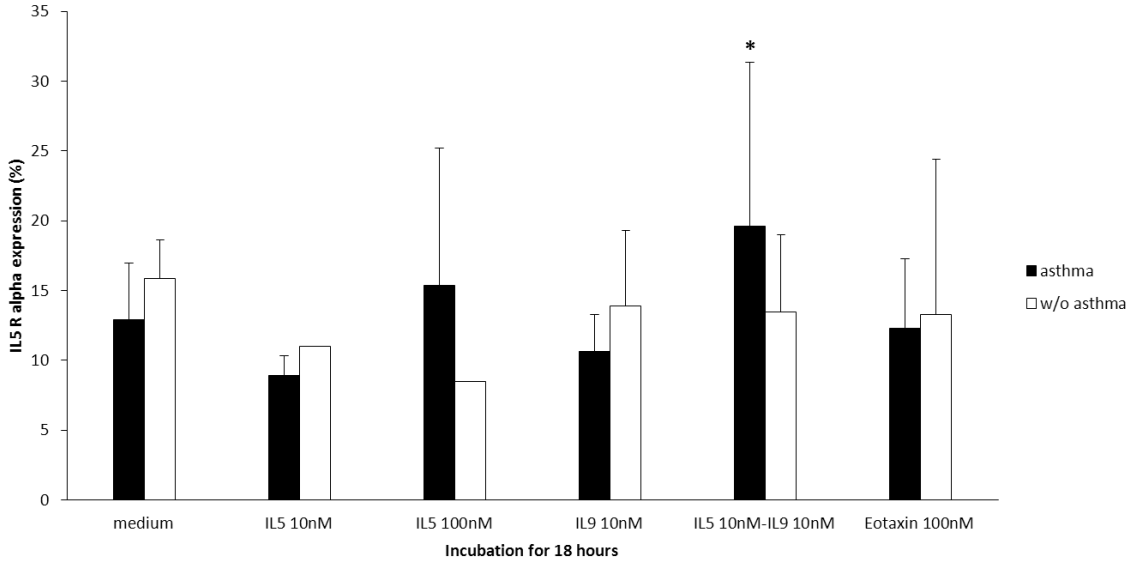


Figure 5. IL-5 receptor alpha expression modulation on EOs after 18-hour incubation with different cytokine conditions in asthmatic (n=7) and non-asthmatic (n=5) patients.

In asthmatic patients, IL-5/IL-9 co-incubation (10nM) increased IL-5Rα expression on EOs by comparison with the medium or IL-5 alone (10nM) (* $p<0.05$).

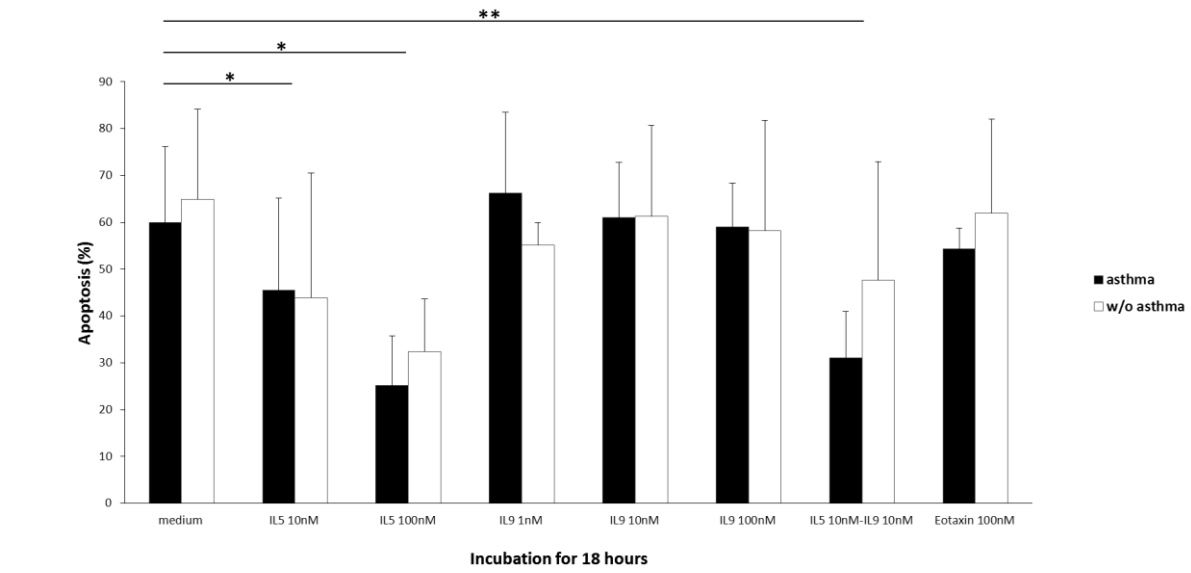


Figure 6. Apoptosis assessment of purified EOs after 18-hour incubation with different cytokine conditions in asthmatic (n=5) and non-asthmatic (n=5) patients.

By comparison with medium alone, IL-5 in a concentration-dependent manner (*$p<0.05$) or IL-5/IL-9 co-incubation (**$p=0.01$) decreased the apoptosis rate. With co-incubation, IL-9 improved the anti-apoptotic action of IL-5 in asthmatic patients.

E-Supplement material

E-Methods

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Purified blood EOs were cytocentrifugated on slides for 2 min at 300 rpm. Cells were fixed with a 1:1 methanol and acetone mixture for 2 min at 4°C.

Nasal polyp staining required 2 types of preparation. For CD69 staining, samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned at 10 µm- thick with an RM-2145™ microtome (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) and mounted on Superfrost™ Plus coated slides (VWR, Radnor, PA). For IL-5Rα staining, samples were frozen in dry ice, cryo-protected by immersion in cold 2- methylbutane, and stored at −80°C before being further sectioned with a cryostat (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) at 12 µm- thick.

Paraffin- embedded polyp slides were cleared in xylene and rehydrated through graded series of alcohol. For the heat- mediated antigen retrieval step, slides were subsequently boiled in 10 mM sodium citrate buffer pH 6.0, maintained at a sub-boiling temperature for 10 min and cooled for 30 min. Cytospin blood EO slides previously stored and polyp slides washed with TBS-Tween 0.05% were incubated with blocking buffer (PBS, 5% decomplemented goat serum) (RαD system, Minneapolis, MN) for 30 min. They were thereafter incubated with monoclonal mouse anti-CD69 (1:25, Abcam, Cambridge, MA) for 30 min at RT. After washing with TBS-Tween 0.05%, slides were incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG (1:100, Vector Labs, Burlingame, CA) for 30 min at RT. Incubation with mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) or secondary antibody alone was used as negative control. After washing unbound secondary antibodies (TBS-Tween 0.05% twice), Vectastain™ ABC-AP reagents (Vector Labs, Burlingame, CA) were used for subsequent incubation with alkaline phosphatase substrate solution for 20 min in the dark. Endogenous peroxidase activity was quenched by levamisole. Slides were washed with distilled water and counterstained with Harris hematoxylin solution (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Lithium carbonate was used to obtain a blue stain. After mounting, slides were observed with Axiolmager™ D1 light microscope (Carl-Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

Frozen sections were thawed before IL-5Rα immunofluorescence staining. Both centrifugated blood EO slides and polyp slides were first stained with hematoxylin and washed 3 times in PBS. After incubation with blocking buffer (PBS, 5% decomplemented goat serum) (RαD system, Minneapolis, MN) for 30 min at RT, polyclonal rabbit anti-IL-5Rα (1:100, Abcam, Cambridge, MA) was added for overnight incubation at 4°C in a humid chamber in the dark.

After washing of unbound antibodies (PBS, 3 times), goat anti-rabbit coupled with FITC-$F(ab')_2$ (1:100, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was added for 2 h in the dark at RT. Incubation with secondary antibody alone was used as negative control. Slides were then washed (PBS, 3 times) immediately prior to mounting with Fluoroshield with DAPI (4′, 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (1:1000, Sigma Aldrich, St Louis, MO). Slides were analysed with fluorescent microscopy (Leica microsystem, Wetzlar, Germany).

E-Results

CD69 and IL-5Rα expression on blood and polyp eosinophils (eFigure 1)

Immunohistochemical and immunofluorescence analyses were performed on purified EOs from blood samples (eFigure 1A-C-E) and on nasal polyps (eFigure 1B-D-F). Positive staining for CD69-labeled samples (eFigure 1A-B) was detected with an avidin-biotin peroxidase staining system that results in a red-brown reaction product. Sections were counterstained with hematoxylin (*blue*) for contrast. IL-5Rα- positive EOs were located on sections with hematoxylin (*blue*) and detected with FITC fluorescence (*green*). The nucleus was counterstained with DAPI *(blue)*. Immunohistochemical analysis for CD69 showed no positive EOs in blood samples (eFigure 1A). EOs in nasal polyps showed positive staining (*red-brown*) for CD69 within inflammatory cells stromal infiltrate (eFigure 1B). In EOs collected from blood samples (eFigure 1C), IL-5Rα fluorescence staining (*green*) was detected on the cell surface and mainly in cytoplasm (eFigure 1E). Beneath the epithelial layer of nasal polyps (eFigure 1D), a weak positive staining for IL-5Rα (*green*) was also observed in EOs (arrows) and in the extracellular space (*) (eFigure 1F).

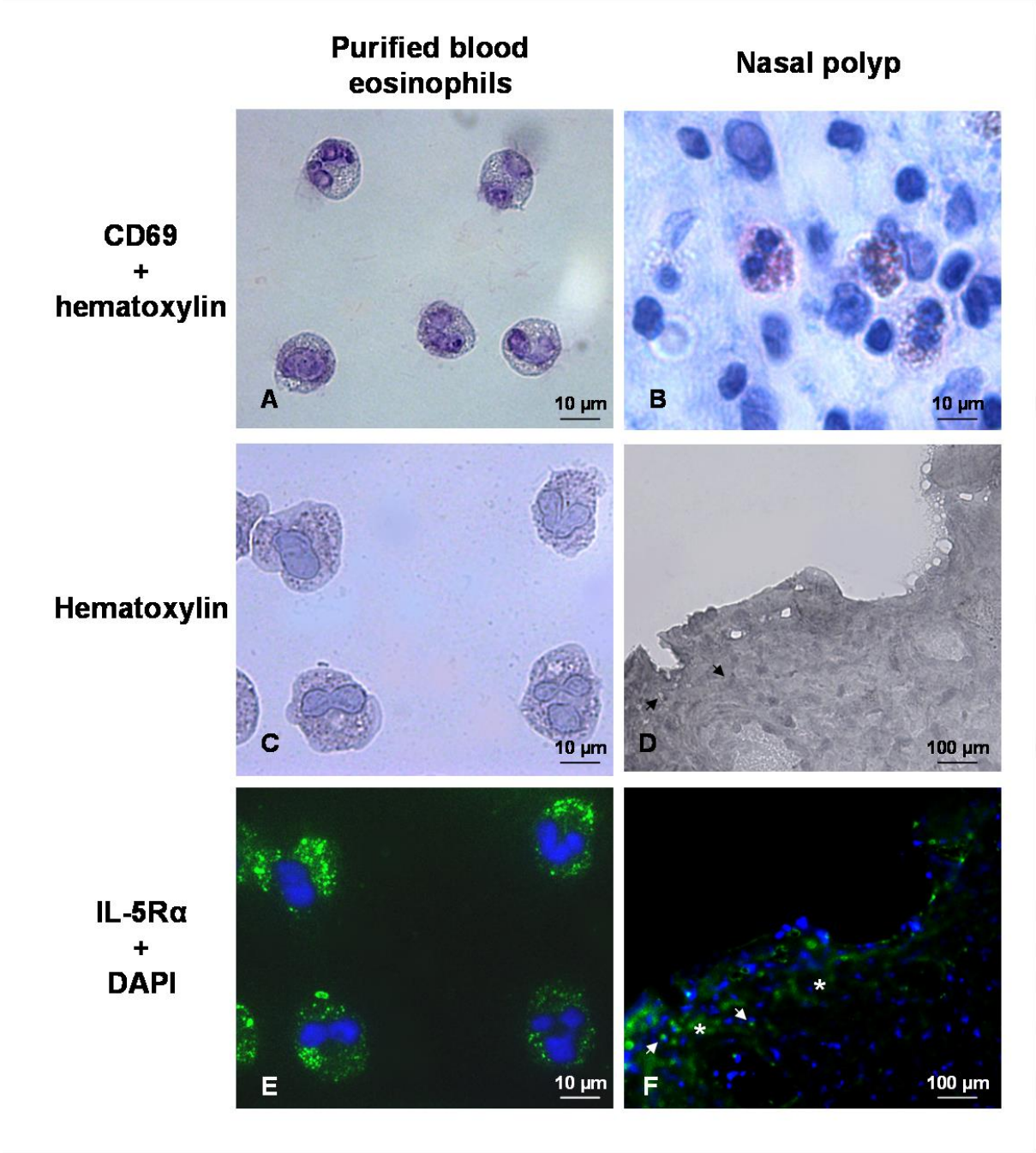
E-Table

eTable 1. Antibodies and isotype controls for flow cytometry and immunohistochemistry analyses.

Name	Supplier	Clone	Isotype
FITC-isotype mouse IgG1	BD Pharmigen	555748	
FITC- monoclonal mouse anti-CD44	BioLegend	BJ18	mouse IgG1
FITC-monoclonal mouse anti-CD69	BioLegend	FN50	mouse IgG1
FITC-monoclonal mouse anti-IL-5Rα	R&D System	26815	mouse IgG1
FITC-monoclonal mouse anti-VLA-4	BD Pharmingen	9F10	mouse IgG1
FITC-monoclonal mouse anti-CD11a	Bender MedSystems	BMS102	mouse IgG1

FITC, fluorescein isothiocyanate.

E- Figure legends



eFigure 1. CD69 and IL-5Rα staining of purified eosinophils from blood sample (A-C-E) and nasal polyp eosinophils (B-D-F).

Herein are depicted relevant qualitative pictures for both asthmatic and non-asthmatic patients. No CD69+ cells were detected in the blood sample (A). In the nasal polyps, CD69+ eosinophils *(red-brown)* were observed within inflammatory cells stromal infiltrate (B). In the blood sample, IL-5Rα fluorescence staining (*green*) was detected on the cell surface and mainly in cytoplasm (C-E). Beneath the epithelial layer of the nasal polyp (D), a positive staining for IL-5Rα (*green*) was also observed in eosinophils (arrows) and in the stroma (*) (F).

III. OBJECTIF 3: CARACTERISATION PHENOTYPIQUE PROTEIQUE DANS LA POLYPOSE NASO-SINUSIENNE

III.A.Contexte

En complément des informations fournies par les analyses portant sur les EOs et afin de bien étayer le profil inflammatoire observé dans la PNS, nous proposons d'établir une cartographie qualitative d'expression protéique dans la PNS et une analyse quantitative d'expression protéique comparative en fonction du statut asthmatique des patients. La technique sélectionnée est celle d'une électrophorèse bidimensionnelle 2D-DIGE (2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis) suivie d'une identification protéique par spectométrie de masse sur les sécrétions nasales puis sur les polypes. Peu de travaux dans la littérature se sont intéréssés à cette évaluation. Simoes *et al.* décrivaient la faisabilité de la technique sur des prélèvements de muqueuse turbinale de sujets sains par brossage. Le profil d'expression obtenu correspondait à des protéines diversement impliquées dans le transport ionique et la détoxification épithéliale (134). Une étude menée sur des prélèvements de polype comparant 7 sujets atteints de PNS et 7 sujets sains décrivait une expression accrue dans la PNS des protéines impliquées dans les mécanismes de défense de l'immunité innée (135). Une autre étude comparant les polypes de 3 sujets atteints de PNS et la muqueuse turbinale de 3 sujets traités pour adénome hypophysaire décrivait une expression différentielle sur plus de 300 protéines avec une surexpression relative dans la PNS de protéines à activité enzymatique (eosinophil lysophospholipase) ou à activité régulatrice (annexine A1 dont l'action est anti-inflammatoire) (136). Une dernière étude comparait les sécrétions nasales de 6 sujets sains et de 6 sujets atteints de rhinosinusite chronique avec ou sans polype par technique de migration monodirectionnelle. Dix protéines d'expression différente étaient sélectionnées pour une caractérisation par spectrométrie de masse. Etait observée dans la rhinosinusite chronique une surexpression de protéines impliquées dans les mécanismes de défense de l'immunité innée (lyzozyme C, lipocain) (137).

En choisissant de comparer les patients atteints de PNS à des sujets sains, ces études s'exposent à détecter un très grand nombre de protéines d'intérêt potentielles pouvant

rendre difficile l'interprétation des résultats. En comparant les patients PNS avec ou sans asthme, nous souhaitons affiner la pertinence de l'analyse et établir un lien avec nos travaux antérieurs. Par ailleurs, aucune de ces études ne fait état de la difficulté représentée par la très grande richesse en albumine des sécrétions nasales et du polype. Rudack *et al.* montraient que l'albumine correspondait à 7,52 mg par 0,1 g de poids sec de polype (138). Lors d'une mise au point préalable, la séparation des protéines par électrophorèse mono et bi-dimensionnelle a mis en évidence la prépondérance de l'albumine au sein des sécrétions nasales. Elle correspondait à plus de 50% de l'intensité du signal par analyse quantitative sur migration électrophorétique monodimensionnelle SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Figure 9). La déplétion de l'albumine nous semble être une étape incontournable. Des études portant sur la comparaison des techniques de déplétion de l'albumine sur sérum ont en effet montré que cette technique permettait d'améliorer la séparation des protéines et l'identification de protéines de faible abondance (139)(140).

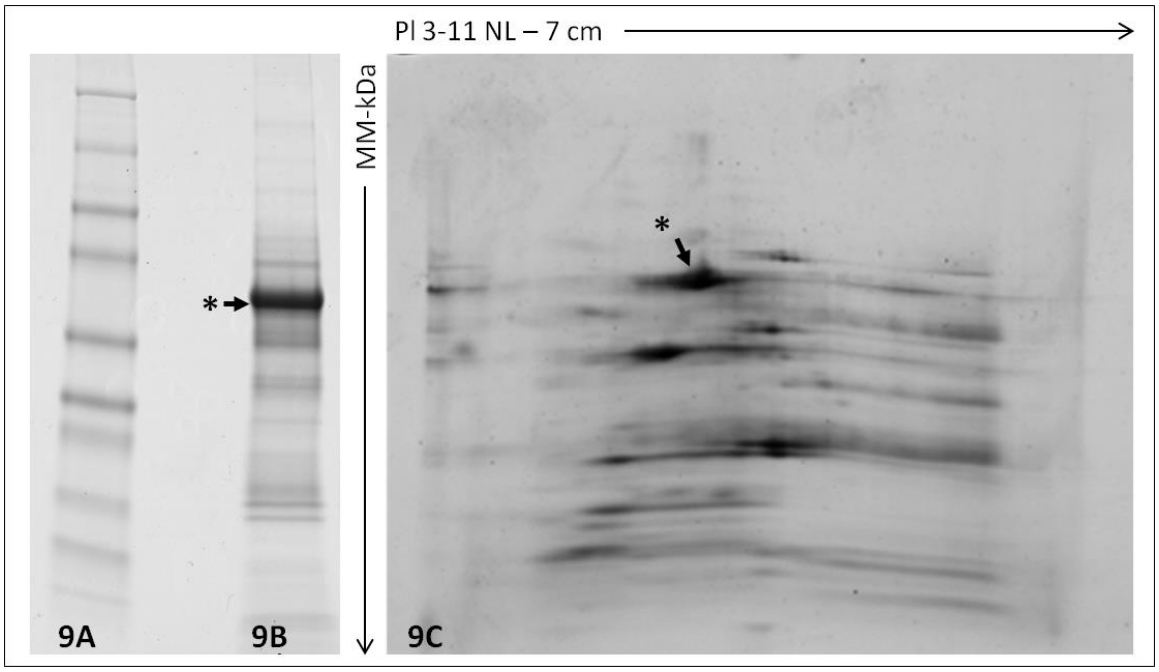


Figure 9: Profil de migration selon la masse moléculaire des protéines de sécrétions nasales par électrophorèse SDS-PAGE (9B) et profil de migration bi-dimensionelle par isoélectrophorèse et SDS-PAGE (9C).

L'albumine (*) est la protéine majoritaire au sein des sécrétions nasales en représentation mono- (9B) ou bi-dimensionelle (9C) sur gel de polyacrylamide. Ce spot majoritaire altère la discrimination des autres protéines d'intérêt potentiel. 9A= indicateur de masse moléculaire.

III.B. Mise au point technique

III.B.1. Population

Les patients étaient recrutés de manière prospective de janvier 2014 à juin 2014 selon le même protocole que celui décrit dans le chapitre matériel et méthodes de la thèse. Afin de réduire les biais potentiels, étaient exclus les patients dont les polypes étaient classés fibreux selon notre classification histologique. Les patients allergiques avec une PNS sans asthme et les patients asthmatiques non allergiques n'étaient pas non plus sélectionnés pour retenir les 2 groupes les plus distincts au sein de cette même pathologie. Sur les 36 patients dont les échantillons (sécrétions nasales et polypes) étaient collectés, 20 étaient finalement retenus. Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4: Population selectionnée pour l'analyse protéomique.

	Sans asthme (n=10)	**Avec asthme allergique (n=10)**	***p***
Age	47,4	49,7	ns
Sexe ratio	8H/2F	7H/3F	ns
Délai avant chirurgie (mois)	96	118	ns
EVA globale (/10)	6,9	8,3	ns
Score de Lilholdt (/3)	2,6	2,65	ns
Score de Lund-Mackay (/24)	18,1	18,3	ns
Antécedent de chirurgie pour PNS	4 polypectomies	3 EEN 1 polypectomie	ns

L'ensemble des travaux porteront initialement sur l'analyse comparative des sécrétions nasales. Celles-ci étaient collectées juste avant le début de l'intervention. Deux cotonoïdes de 1,27cm×2,54cm (Codamn, Raynham, MA) étaient placés dans chaque fosse nasale pendant 5 minutes. Les cotonoïdes étaient ensuite placés dans un tampon TRIS 10 mM contenant un cocktail d'anti-protéases Complete Mini (Roche, Mannheim, Germany) puis dans de la glace jusqu'à leur traitement en vue de l'approche protéomique. Après lacération des cotonoïdes et incubation d'une heure sous agitation sur de la glace dans une solution de TRIS 10 mM contenant le cocktail d'anti-protéases et le CHAPS comme détergent, les sécrétions nasales étaient ensuite centrifugées à 10000g pendant 10 minutes sur des colonnes de filtration Amicon Pro Purification System™ (Millipore, Darmstadt, Germany) pour éliminer les résidus de cotonoïdes et les viscosités. Les échantillons étaient

ensuite concentrés sur colonnes Amicon Ultra 3K™ (Millipore), aliquotés et conservés à -80°C.

III.B.2. Méthode de déplétion de l'albumine

Deux méthodes de déplétion de l'albumine sur sécrétions nasales étaient comparées lors de la phase de mise au point technique : la méthode par affinité protéique utilisant classiquement un colorant chlorotriazinique, le bleu de cibacron et la méthode par interaction antigène/anticorps. Ce sont actuellement les procédés les plus décrits dans la littérature (139). Etaient sélectionnés dans le commerce 2 kits : le Pierce™ Albumin Depletion Kit (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL) pour la méthode par affinité protéique au bleu de cibacron et le ProteoPrep™ Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) pour la méthode par interaction antigène/anticorps permettant d'éliminer à la fois l'albumine et les IgG. Les recommandations du fabriquant étaient respectées. Brièvement, les échantillons étaient mis en contact avec une résine active (Pierce™) ou un tampon dit d'équilibration (ProteoPrep™) pendant 2 à 5 min. La fraction déplétée non fixée à la résine ou au tampon était récupérée sur colonne de centrifugation après lavage par tampon commercial à plusieurs reprises.

Les échantillons initiaux non déplétés et les échantillons déplétés étaient ensuite analysés sur gel 1D (mono-dimensionnel) pour comparer les profils protéiques. Après dilution dans une solution de Laemmli (Bio-Rad) + 10% dithiothréitol (DTT), la séparation protéique était réalisée sur gels en gradient d'acrylamide 4-20% (Mini Protean TGX™ Precast Gel, Bio-Rad, Hercules, CA) pendant 90 minutes à 130 V dans une cuve Mini Protean Tetra System (Bio-Rad). Le gel était ensuite coloré au bleu G250 (10% acide acétique, 50% de solution d'éthanol, 0,1% bleu G250) pendant 30 minutes puis lavé. Le gel était finalement traité par le lecteur GS-800™ Calibrated Imaging Densitometer (Biorad). L'étude qualitative et quantitative des bandes protéiques obtenues était réalisée par le logiciel Phoretix™ 1D gel analysis software (TotalLab, Newcastle, GB).

III.B.3. Analyse des 20 patients par électrophorèse bi-dimensionnelle quantitative (2D DIGE)

Dix gels étaient réalisés. Chaque gel contenait le contenu protéique des sécrétions nasales d'un patient atteint d'une PNS isolée (50µg), le contenu protéique de sécrétions nasales d'un patient atteint d'une PNS avec un asthme allergique (50µg), associé alternativement pour chaque gel soit au fluorochrome Cy3 soit au Cy5, et le contenu protéique des sécrétions nasales d'un standard interne (50µg) associé au fluorochrome Cy2. Le standard interne permettant la normalisation des données correspondait au regroupement des protéines de l'ensemble des patients.

Les 3 échantillons marqués (150µg) étaient mélangés au tampon de réhydratation (8M urée, 2M thiourée, 10mM DTT, 2% CHAPS, 1% pH 3 tampon IPG et quelques traces de bleu de bromophénol) puis déposés dans une cuve au contact de strips de 18 cm pH 3-11 NL (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, GB). Après réhydratation passive des strips pendant 12 à 18 heures, la focalisation iso-électrique était réalisée à 20°C sur dispositif IPGphor3 (GE healthcare) jusqu'à atteindre 40kVh. Les strips étaient ensuite incubées 15 min dans un tampon d'équilibration (6M urée, 2% SDS, 30% glycérol, 50 mM Tris-HCl pH 8,8) avec successivement 1% DTT puis 4,7% d'iodoacetamide. Après rinçage, les strips étaient placées sur gel de polyacrylamide conçu selon un gradient 8-18% pour une électrophorèse à 20°C dans le noir à 2,5 W/ gel sur la nuit. Les images des gels étaient acquises sur un imageur Typhoon Variable Mode Imager 9400™ (GE Healthcare Life Sciences). L'analyse est réalisée sur logiciel SameSpots™ (TotalLab). Les données étaient interprétées sur un logiciel de traitement statistique DeCyder software 6.5 (GE Healthcare Life Sciences). Un spot était considéré comme exprimé de manière différentielle entre les 2 conditions (PNS isolée et PNS avec asthme allergique) lorsque les ratios d'expression normalisés par rapport au standard interne étaient supérieurs à 1,5 ou inférieurs à 1,5 avec un test t des Student retrouvant un seuil de significativité statistique ≤ 0,05.

III. C. Résultats préliminaires

III.C.1. Choix de la technique de déplétion de l'albumine

La mise au point technique a été réalisée pour chaque protocole sur 2 échantillons en triplicate. La méthode par affinité protéique au bleu de cibacron Pierce™ Albumin Depletion Kit ne permettait pas de dépléter efficacement les sécrétions nasales. La méthode par interaction antigène/anticorps ProteoPrep™ Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion Kit réduisait le taux d'albumine à 1,8 % (Figure 10). L'analyse Phorétix™ a mis en évidence que cette méthode augmentait la capacité de détection de protéines faiblement exprimées. Le nombre de bandes détectées passait de 16 avant déplétion à 23 après déplétion (Figure 11). Cette technique était sélectionnée pour les 20 patients avec un taux moyen d'albumine avant déplétion de 50,2% et un taux moyen d'albumine après déplétion de 2,5%. Les profils éléctrophorétiques 1D réalisés pour les 20 patients étaient relativement homogènes confirmant l'intérêt de l'analyse qualitative et quantitative différentielle.

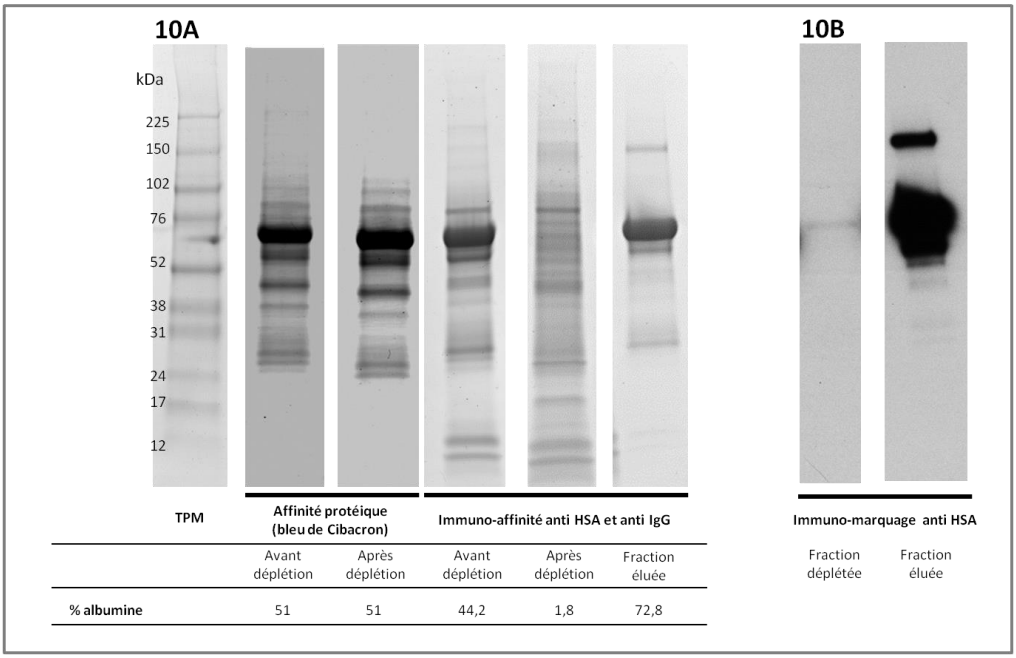


Figure 10: Analyse par migration 1D SDS-PAGE des profils protéiques (10A) et immunomarquage par Western Blot anti-HSA (10B).

Les profils protéiques obtenus avant et après déplétion étaient comparés pour chacune des 2 techniques d'extraction de l'albumine humaine (HSA). La fraction éluée correspondait à la fraction protéique restée fixée aux anticorps anti HSA et anti IgG. La technique par immuno-affinité réduisait la fraction d'albumine dans l'échantillon à 1,8%. La méthode par affinité protéique était inefficace (10A). L'analyse par immunomarquage de la fraction déplétée confirmait la spécificité de l'extraction (10B). (TPM = traceur de masse moléculaire).

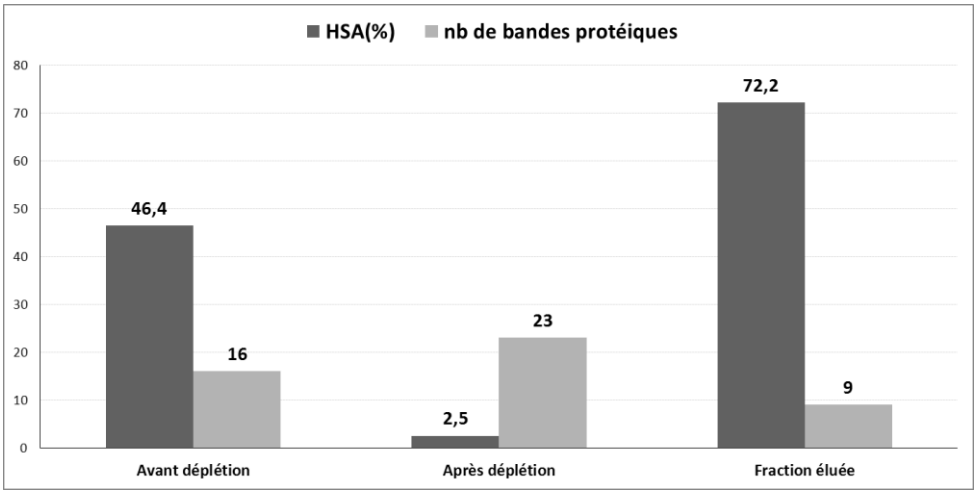


Figure 11: Analyse quantitative après migration 1D SDS-PAGE de la déplétion de l'albumine par technique d'immuno-affinité.
La proportion relative en albumine (HSA) est diminuée de 94,6% après déplétion. Le nombre de bandes protéiques détectées est augmenté de 30,4%. La fraction éluée contient majoritairement de l'albumine. Certaines bandes protéiques sont détectées sur la fraction éluée traduisant la possibilité d'éliminer de manière inopinée certaines protéines par fixation non spécifique à l'anticorps ou à l'albumine.

III.C.2. Identification de spots d'intérêt

Les 20 patients inclus étaient comparés par 2D-DIGE afin d'établir une carte d'expression protéique pour les 2 conditions cliniques (PNS isolée et PNS associée à un asthme (Figure 12). Au total, 1084 spots étaient identifiés par le logiciel SameSpots sur le standard interne.

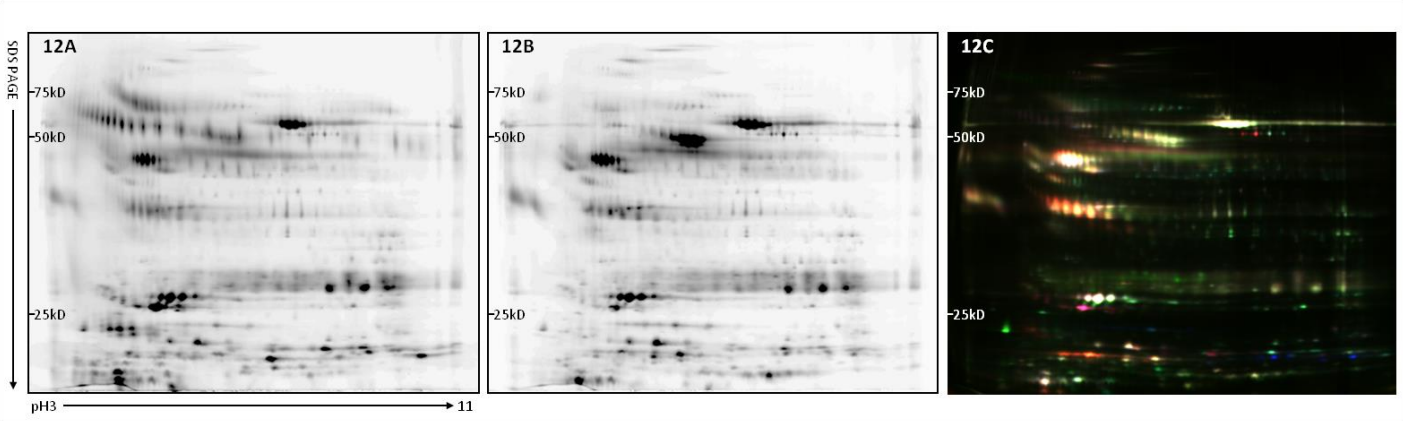


Figure 12: Images représentatives de gels 2D-DIGE comparant les sécrétions nasales des sujets atteints de PNS isolée et de PNS associée à un asthme allergique.
Carte protéomique d'un sujet atteint de PNS isolée associée au fluorochrome Cy3 (12A) et d'un sujet atteint de PNS associée à un asthme allergique associée au fluorochrome Cy5 (12B)**.** Images superposés du standard interne associé au fluorochrome Cy 2 (12C). Les spots colorés en blanc sont exprimés de manière équivalente entre les 2 groupes de sujet. Les spots colorés en vert (Cy3) sont surexprimés pour le sujet atteint de PNS isolée, les spots colorés en rouge (Cy5) sont surexprimés pour le sujet avec une PNS associée à un asthme allergique.

Au terme du protocole de 2D-DIGE, l'analyse préliminaire des résultats met en évidence 47 spots différentiellement exprimés entre les 2 groupes de patients, définis selon les critères de sélection (différence > 1.5 et p-value < 0.05) (Figure 13).

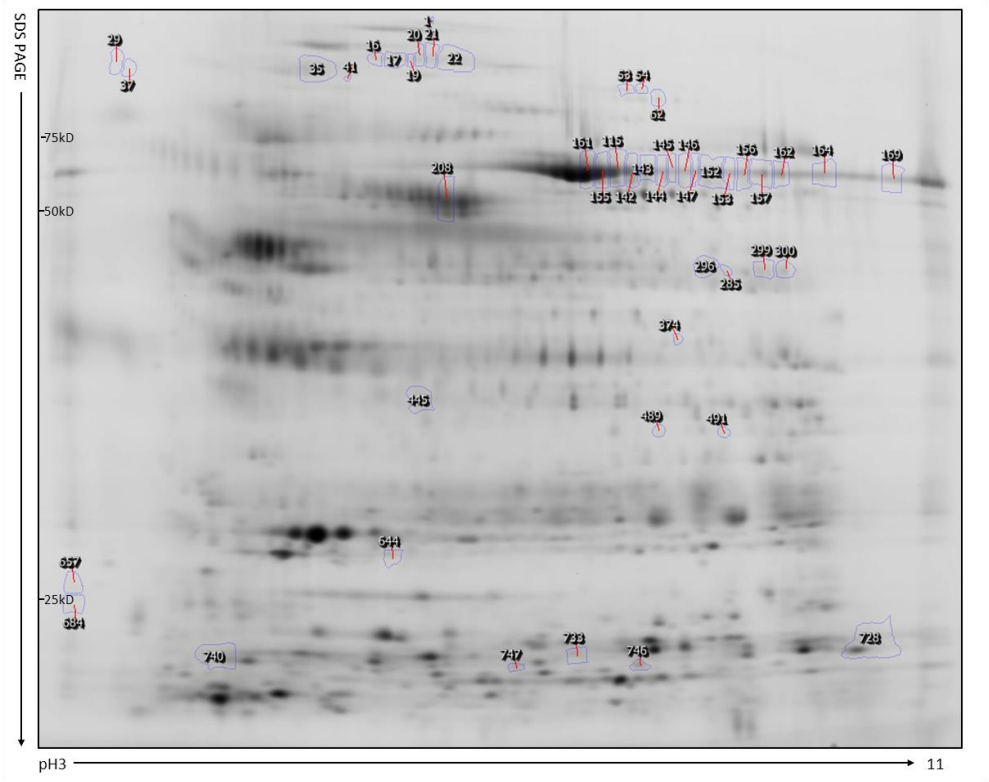


Figure 13: Identification par le logiciel SameSpots des spots différentiellement exprimés.
Sur ce gel, sont entourés les spots d'expression différentielle selon un rapport de +1,5 ou -1,5 entre les 2 groupes de patients avec un seuil de significativité statistique p≤0,05.

III.D. Synthèse

Ces résultats préliminaires soulignent l'importance de la déplétion de l'albumine jusqu'ici non évoquée dans les travaux publiés portant sur l'analyse protéique dans la PNS. Cette déplétion permet de démasquer des protéines de faible expression dont l'analyse différentielle pourrait être utile. Notre protocole de 2D-DIGE a permis de confirmer la faisabilité de la méthode.

L'identification des spots par spectrométrie de masse et par consultation de bases de données protéomiques aura pour objectif d'établir un lien avec les analyses phénotypiques menées dans la thèse sur les EOs. L'analyse qualitative de l'ensemble des spots identifiés sur

les sécrétions nasales permettra aussi de caractériser le profil d'expression protéique chez les patients atteints de polypose naso-sinusienne, cette analyse n'ayant jamais été réalisée auparavant.

DISCUSSION

I. DESIGN DE L'ÉTUDE

Le design des travaux présentés dans la thèse s'appuie sur une méthode de sélection stricte des patients permettant de renforcer l'homogénéité des informations recueillies. Ont été choisis uniquement les patients en échec du traitement médical pour lesquels une indication opératoire était retenue. Ces patients ont été recrutés de manière prospective et ont été pris en charge par un seul opérateur assurant le recueil de l'ensemble des échantillons tissulaires. Une période d'exclusion de 1 mois de toute corticothérapie topique et générale avant la chirurgie a été choisie, en référence aux travaux publiés, pour limiter la variabilité potentielle de la réponse inflammatoire locale.

L'une des critiques qui peut être formulée à l'encontre de ce design est le choix de restreindre les analyses aux patients avec une PNS réfractaire au traitement médical. Ce groupe limité n'est peut-être pas comparable à la majorité des patients présentant une PNS répondant bien à la corticothérapie. Il nous est néanmoins apparu nécessaire de nous focaliser sur ces formes résistantes de PNS puisque ce sont celles qui posent le plus de problèmes en termes de prise en charge. Réaliser un prélévement de polype chez un patient ne nécessitant pas de geste chirurgical aurait par ailleurs posé des problèmes éthiques ayant pu retarder de manière significative la mise en place d'une étude.

Alors que la plupart des travaux publiés ont comparé les patients PNS à des sujets purement allergiques traités par chirurgie turbinale ou à des sujets sains sur le plan inflammatoire traités pour une pathologie septale (41)(96)(114), nos analyses ne portent que sur des patients atteints de PNS en essayant d'établir une comparaison phénotypique en fonction des comorbidités (asthme, allergie). Ce protocole rend plus difficile l'identification d'une différence sur le plan histologique ou biologique. Il vise pourtant à répondre aux questions que peut se poser le clinicien ; celles de pouvoir discerner des sous-groupes de patients au sein d'une même pathologie.

II. DONNEES HISTOLOGIQUES

La classification histologique établie à l'issue de la première partie de cette étude a permis une caractérisation précise de l'architecture du polype au cours de la PNS. La

description d'un polype le plus souvent oedémateux et riche en EOs correspond à la forme majoritairement observée dans la littérature (141). Nos travaux confirment cette description sur une population homogène en dehors de toute corticothérapie pouvant modifer la réaction inflammatoire locale. Ils permettent aussi de souligner la présence d'une forme plus hétérogène de polype dit « intermédiaire » correspondant bien à la coexistence au sein d'un même patient de polypes plus ou moins oedèmateux avec une infiltration lymphocytaire variable. La plupart des travaux publiés ne tiennent pas compte de cette hétérogénéité en ne décrivant que l'aspect histologique majoritaire au sein d'une coupe de tissu (69). La rareté de la forme fibreuse, y compris chez des patients déjà opérés, confirme aussi que la chirurgie ne peut à elle seule garantir l'installation d'une fibrose tissulaire pouvant contenir la reprise d'une réaction inflammatoire conduisant à un nouvel œdème. La chirurgie favorise la diffusion locale des corticoïdes topiques mais ne peut pas à elle seule contrôler la maladie en modifiant le remodelage tissulaire.

Notre étude n'a pas permis d'établir un lien entre le phénotype histologique et la présence d'un asthme associé à la PNS. Les mêmes résultats étaient observés par Berger *et al.* avec une classification histologique différente (70). Cette co-morbidité étant souvent associée aux formes de PNS réfractaires au traitement (109)(110), la corticorésistance observée chez ces patients asthmatiques ne serait donc pas dépendante d'une particularité de structure du polype le rendant inaccessible aux corticoïdes. Cette corticorésistance serait plutôt liée aux processus de signalisation cellulaire qui sous-tendent la réaction inflammatoire tissulaire. Les phénomènes de métaplasie épithéliale observés dans notre étude chez les patients asthmatiques peuvent ainsi s'expliquer par la libération de nombreux médiateurs cytotoxiques dans un environnement riche en EOs. Le lien statistique observé dans notre étude entre éosinophilie et asthme confirme le rôle de l'éosinophilie tissulaire en tant que marqueur phénotypique et marqueur potentiel de corticorésistance de la PNS associée à l'asthme. Pourtant cette notion n'a de valeur que si l'on tient compte du contexte épidémiologique. Les travaux réalisées sur des populations asiatiques (102)(106) ont bien souligné la diversité des profils dès lors que des facteurs ethniques, environnementaux et potentiellement génétiques viennent modifier la réaction inflammatoire.

Renforcer notre connaissance de l'EO et des marqueurs cytokiniques associés à l'asthme nous est apparu essentiel dans la perspective de futurs travaux de recherche translationelle visant à obtenir un impact thérapeutique.

III. RÔLE DE L'ÉOSINOPHILE

L'hyperéosinophilie tissulaire dans la PNS est tributaire de phénomènes de domiciliation tissulaire et de survie de l'EO explorés dans la deuxième partie de cette étude. Les mécanismes de domiciliation tissulaire mettent en jeu l'expression de molécules d'adhérence (ex: β intégrines) (142) et de glycoprotréines membranaines (ex: CD44)(143) favorisant l'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire. L'expression de ces molécules d'adhérence serait favorisée à la surface des EOs circulants par les taux élevés d'IL-5 observés notamment dans l'asthme (144). L'hyperéosinophilie dans la PNS implique que les cellules soient maintenues piégées au sein du tissu. Nous décrivons pour la 1ère fois dans la PNS une modulation de l'expression membranaire des β intégrines et du CD44 sur des EOs sanguins et tissulaires purifiés. Le CD44, considéré comme une molécule d'adhérence précocement impliquée dans la migration tissulaire des EOs (143)(145), voit son taux d'expression diminuer à la surface des EOs du polype. Les mêmes observations sont faites pour le VLA-4 et le LFA-1. L'un des biais techniques qui pourrait être évoqué pour expliquer cette diminution d'expression serait l'abrasion mécanique et enzymatique subie pas les EOs lors des protocoles de purification tissulaire. Cette hypothèse peut être écartée par l'observation dans les mêmes conditions techniques d'une augmentation d'expression d'autres marqueurs d'activation à la surface des EOs tissulaires (CD69). Des travaux menés sur des EOs issus de lavage broncho-alvéolaire et du sang de patients asthmatiques ont permis de décrire différents états d'activation des β intégrines (146). Des mécanismes de modulation de la conformation protéique rendraient l'intégrine plus ou moins accessible à son ligand. La diminution relative des taux d'expression observés dans notre étude pourrait être liée à l'inaccesibilité de l'anticorps utilisé en cytométrie à son site de fixation sur l'intégrine. La même explication pourrait être formulée pour le CD44 dans la mesure où cette glycoprotéine a aussi été décrite sous différentes isoformes (147). Nous supposons ainsi qu'une modulation de structure des protéines d'adhérence, dont l'expression est favorisée par l'IL-5, permettrait d'assurer la domiciliation des EOs au sein du polype.

La survie tissulaire des EOs détermine aussi l'hyperéosinophilie dans la PNS. Cette survie est dépendante de l'environnement cytokinique. Les particularités de cet environnement cytokinique ont été étudiées dans la thèse en relation avec le contexte clinique.

IV. RÔLE DE L'ENVIRONNEMENT CYTOKINIQUE

En accord avec les travaux de Bachert et *al.*, la présence d'un asthme détermine dans notre étude un profil immuno-phénotypique marqué par une expression plus élévée de l'IL-5 et des IgE dans les sécrétions nasales alors que les taux sériques d'IgE ne sont pas différents entre sujets asthmatiques et non asthmatiques (Annexe 1) . A l'inverse, les taux d'IgE et d'IL-5 entre sujets allergiques et non allergiques au sein des sécrétions nasales n'étaient pas différents alors que les taux sériques en IgE totales étaient plus élévés chez les allergiques dans la population PNS étudiée (Annexes 1 et 2). Ces résultats viennent corroborer l'hypothèse physiopathologique d'une réaction antigènique locale, indépendante du statut allergique du patient, permettant une production IgE polyclonale par les lymphocytes B et une libération accrue d'IL-5 favorisant le recrutement des EOs (105). Ces EOs subissent alors un processus d'activation comme en témoigne l'augmentation de l'expression membranaire du CD69. Il s'agirait de la mobilisation membranaire d'un pool intracellulaire de CD69 favorisée par l'IL-5 (148). Des travaux préliminaires à la thèse montraient en cytométrie la présence d'un taux intracellulaire élevé de CD69 au sein des EOs tissulaires purifiés quel que soit le statut asthmatique des patients.

La corrélation positive observée entre taux d'EDN et score tomodensitométrique de Lund-Mackay souligne l'implication directe des EOs dans le remodelage tissulaire à l'origine de la formation des polypes. Des travaux similaires portant sur le dosage de l'ECP dans les sécrétions nasales montraient des taux plus élévés d'ECP chez les patients avec une PNS et un asthme. L'allergie n'avait pas d'impact. Les taux d'ECP étaient aussi corrélés au score tomodensitométrique (66).

Le rôle de l'IL-5 dans la survie des EOs est confirmé dans nos travaux par l'action anti-apoptique de cette cytokine sur des EOs purifiés en culture. De manière assez surprenante, une diminution relative de l'expression membranaire de l'IL-5Rα est observée sur les EOs tissulaires de patients asthmatiques. Dans un environnement riche en IL-5, un mécanisme de modulation interviendrait pour diminuer l'expression membranaire de ce récepteur. Le récepteur de l'IL-5 est composé d'une sous-unité alpha spécifique et d'une sous-unité béta, assurant la transduction du signal, partagé avec l'IL-3 et le GM-CSF (granulocyte/ macrophage-colony stimulating factor). Une diminution dose-dépendante de l'expression membranaire de la sous unité alpha du récepteur à l'IL-5 (IL-5Rα) sur des EOs sanguins

purifiés de sujets sains après incubation avec de l'IL-5 a été décrite dans la littérature (149). Des résultats comparables ont également été observés par Liu *et al. in vivo* après stimulation antigénique de patients asthmatiques sur des EOs issus de lavage bronchoalvéolaire (115). Cette diminution d'expression n'était pas retrouvée sur les EOs sanguins purifiés de ces mêmes patients. De plus, les auteurs décrivaient une augmentation de la forme soluble du récepteur à l'IL-5 (sIL-5Rα) dans le lavage broncho-alvéloaire. Des travaux complémentaires menés par la même équipe attribuaient la diminution d'expression membranaire de l'IL-5Rα à un processus de clivage enzymatique du récepteur en position membranaire dépendant des MMPs (116). D'autres mécanismes d'internalisation de l'IL-5Rα ou de régulation transcriptionnelle étaient aussi évoqués (117). Ce processus de modulation d'expression de l'IL-5Rα a été avancé pour expliquer l'efficacité variable des thérapies ciblées anti-IL-5 dans l'asthme sur des EOs devenus partiellement IL-5 indépendant. Les essais menés dans la PNS avec le mepolizumab ou le reslizumab ont aussi montrés une efficacité partielle de ces thérapies ciblées (100)(99). Sur la base des travaux menés dans l'asthme, Gevaert *et al.* ont ainsi observé, sur des homogénats de polypes, une diminution de l'expression de l'IL-5Rα par comparaison aux EOs sanguins purifiés quel que soit le statut respiratoire (96). Nos travaux, réalisés pour la première fois dans la littérature sur des EOs tissulaires purifiés, ne corroborent pas complètement ces résultats. Nous montrons une augmentation globale de l'expression de l'IL-5Rα sur les EOs tissulaires par comparaison aux EOs sanguins mais une diminution relative de l'expression de l'IL-5Rα sur les EOs tissulaires de patients asthmatiques. Notre approche immunophénotypique sur cellules purifiées sanguines et tissulaires semble être plus appropriée pour établir un comparatif et peut expliquer la divergence de résultats observés avec l'équipe de Gevaert. L'augmentation globale d''expression de l'IL-5Rα sur les EOs tissulaires conforte l'hypothèse d'une modulation de l'EO favorisant son activation et sa survie. La diminution relative d''expression de l'IL-5Rα sur les EOs tissulaires chez les patients asthmatiques peut être rapprochée des mécanismes d'immunomodulation décrits dans l'asthme dans un environnement relativement plus riche en IL-5. Dès lors, comment expliquer l'efficacité accrue du traitement par le reslizumab chez les patients atteints de PNS présentant un taux d'IL-5 plus élevé dans les sécrétions nasales (99) et comment expliquer l'éosinophilie tissulaire finalement plus prononcée chez les patients asthmatiques ?

Nos analyses fonctionnelles sur EOs purifiés en culture nous amènent à considérer la probable intrication de plusieurs mécanismes de régulation permettant d'entretenir la réaction inflammatoire. L'IL-9, produite par les lymphocytes T et les mastocytes, est impliquée dans la réponse immunitaire Th2 dépendante (119). Son rôle d'induction de l'expression de l'IL-5Rα a été analysé chez des patients asthmatiques sans polypose (125). Le rôle de cette cytokine n'a pas été étudié jusqu'ici dans la PNS. Nous observons une concentration plus élévée d'IL-9 sur polype de patient asthmatique. Ce taux n'était pas augmenté chez les patients allergiques (Annexe 2). Nous montrons que l'IL-9 en présence d'IL-5 est capable d'induire l'expression de l'IL-5Rα et de favoriser l'action anti-apoptotique de l'IL-5 chez les asthmatiques. Nous supposons ainsi que l'action conjointe de l'IL-5 et de l'IL-9 vient contrebalancer la diminution relative d'expression de l'IL-5Rα chez ces patients au sein du polype. Cette hypothèse n'a pu être testée directement sur les EOs tissulaires en raison des faibles populations cellulaires obtenues après purification sur polype, restreignant les analyses cytométriques. Outre son action sur l'expression de l'IL-5Rα, l'IL-9 est aussi impliquée dans la production de protéases par les mastocytes et dans la libération d'IgE par les lymphocytes B (150). Cette cytokine pourrait donc également intervenir dans les processus de remodelage tissulaire.

V. CARACTÉRISATION PHENOTYPIQUE

L'ensemble de nos données souligne bien l'interdépendance des cytokines proinflammatoires et le rôle intriqué des mécanismes de l'immunité innée et acquise au cours de la PNS. Ces mécanismes sont impliqués selon une intensité dépendante des conditions cliniques. Alors que l'allergie n'apparaît pas comme un facteur déterminant, l'asthme associé à la PNS constitue une comorbidité majeure. Nos résultats ont montré la dichotomie qu'il est possible d'établir entre les patients sans asthme et les patients avec asthme en termes d'expression de marqueurs inflammatoires et d'immunomodulation des EOs confortant ainsi le concept de phénotype évoqué dans la littérature (Figure 14). Ikeda *et al.* proposaient de distinguer les PNS selon la richesse relative du polype en cellules inflammatoires (151). Bachert *et al.* établissaient une classification globale des rhinosinusites chroniques basée sur l'architecture du polype et le profil lymphocytaire Th et une

classification spécifique des PNS basée sur le taux d'expression en IgE et en IL-5, ces 2 facteurs déterminant la probabilité d'association à un asthme (104).

Ces concepts permettent de clarifier la description clinique et biologique de la PNS mais ne parviennent pas à expliquer l'histoire naturelle de cette pathologie. Pouvons-nous supposer qu'il existe une continuité physiopathologique entre les patients atteints de PNS non asthmatiques et asthmatiques, ces 2 conditions ne se distinguant que par une variation des taux d'expression de médiateurs inflammatoires ? Ne peut–il pas s'agir au contraire de 2 situations pathologiques différentes se traduisant toutes les 2 par la présence de polypes le plus souvent oedémateux ?

Une analyse plus large de l'expression protéique, pouvant potentiellement répondre à cette question, constituait notre 3ème objectif. Par comparaison aux travaux antérieurs (130-133), notre étude s'est focalisée uniquement sur les patients atteints d'une PNS. Sur les 1084 spots identifiés par cette approche, 4,3% étaient exprimés différentiellement entre les patients asthmatiques et non asthmatiques. Les données obtenues par ces analyses préliminaires doivent être affinées sur le plan statistique. Ces résultats confirment néanmoins l'importance du contexte clinique dans la caractérisation phénotypique de la PNS. Le recours à une méthode de déplétion de l'albumine, non spécifiée par les études publiées, permet aussi de démasquer des protéines de faible expression et d'affiner la pertinance du traitement des données jusqu'ici obtenues. Les résultats attendus sur les sécrétions nasales seront aussi comparés à ceux que nous souhaitons mener sur les polypes. Cette analyse sur les polypes pourrait aussi permettre de préciser le rôle de l'interface épithéliale dans la régulation de l'inflammation au cours de la PNS.

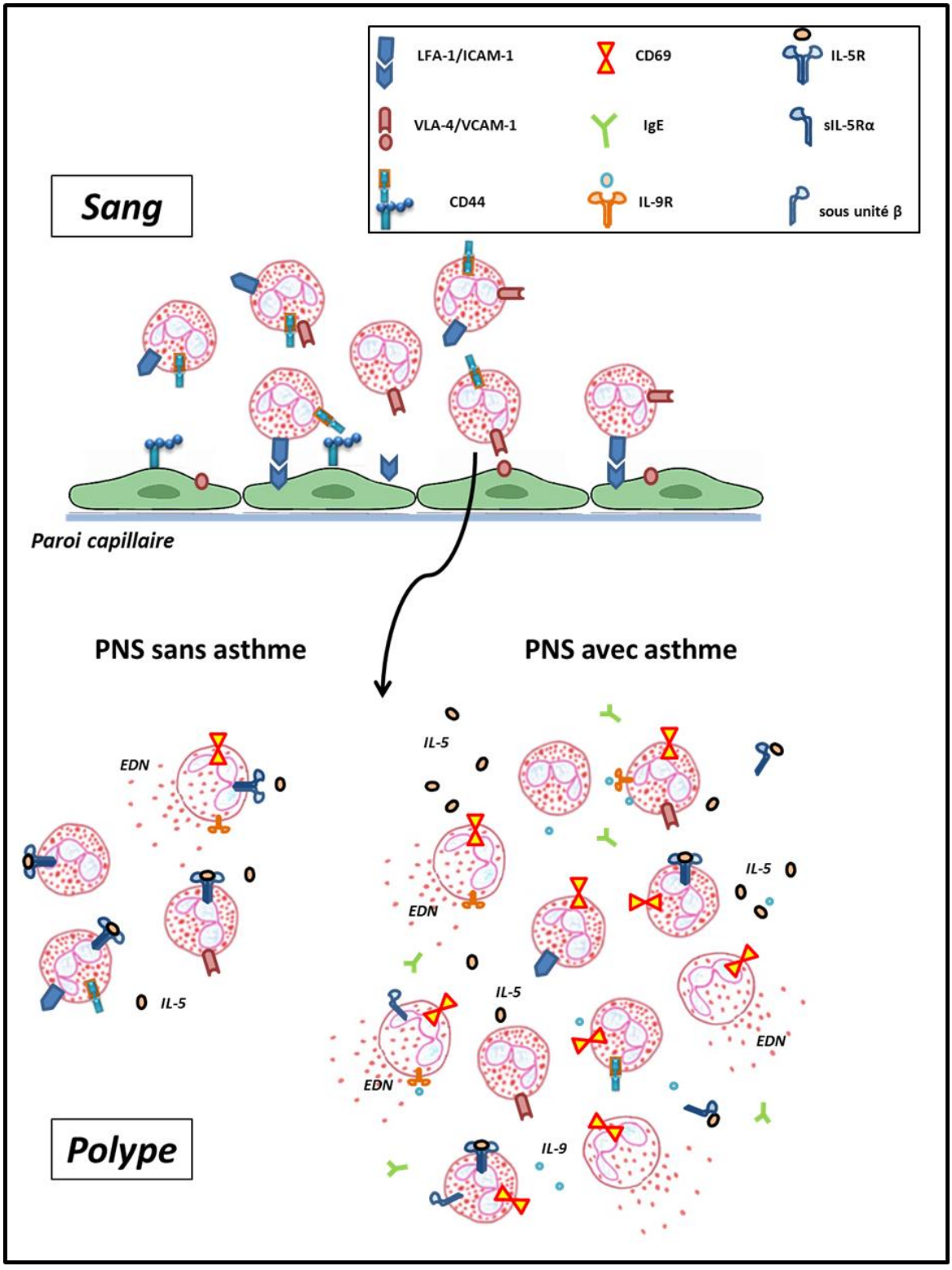


Figure 14: Profil phénotypique immuno-inflammatoire au cours de la PNS en fonction du statut asthmatique.

La migration trans-endothéliale des EOs s'accompagne d'une diminitution d'expression des β intégrines et du CD44 à l'origine de l'hyper-éosinophilie tissulaire. En cas d'asthme associé, on observe un profil d'activation CD69 des EOs avec dégranulation intense (EDN). L'expression de l'IL-5R, dans un environnement riche en IL-5 et en IgE, est diminuée relativement par rapport aux patients non asthmatiques. L'IL-5Rα serait clivé de la sous-unité β et libéré sous forme soluble dans la matrice extracellulaire. L'IL-9, plus exprimée en cas d'asthme associé, viendrait restaurer la sensibilité à l'IL-5 et favoriser la survie des EOs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux portant sur une population sélectionnée de patients réfractaires à la corticothérapie nous ont permis de souligner l'importance de la caractérisation immuno-phénotypique du processus inflammatoire au cours de la polypose naso-sinusienne en relation avec le statut asthmatique.

L'approche histo-pathologique montre la communauté architecturale de la PNS quelles que soient les comorbidités associées.

L'analyse des marqueurs inflammatoires exprimés dans le polype et dans les sécrétions nasales met en évidence l'importance des mécanismes de l'immunité adaptative en cas d'asthme associé. Un profil riche en IgE et IL-5 caractérise ces patients quel que soit leur statut allergique.

Par une approche de purification cellulaire jusqu'ici jamais exploitée dans la littérature portant sur la PNS, nos analyses menées sur des populations d'EOs sanguins et tissulaires ont permis d'appréhender l'intrication des processus de régulation assurant le maintien de l'inflammation tissulaire. De telles analyses pourraient aussi être menées sur les populations lymphocytaires; le rôle de ces cellules ayant été souligné par les travaux publiés comparant les profils cellulaires entre les sujets caucasiens et asiatiques au sein de la muqueuse nasale.

L'action conjointe des cytokines Th2 nous montre la complexité et la multiplicité des mécanismes de régulation de l'hyper-éosinophilie. Nos analyses sur l'IL-9 ont permis de préciser le rôle de cette cytokine sur la régulation de l'expression de l'IL-5Rα et la survie des EOs. L'action de l'IL-9 est ici décrite pour la 1ère fois dans la PNS. Ces résultats laissent penser que d'autres cytokines pourraient aussi agir conjointement. L'IL-25 et l'IL-33 récemment analysées dans la PNS pourraient ainsi faire l'objet de futurs tests fonctionnels portant sur la modulation de survie des EOs.

A l'issue de notre étude, Il nous semble qu'une approche thérapeutique ciblée contrecarrant les voies de signalisation inflammatoire dans la PNS ne pourra se concevoir qu'en agissant simultanément sur plusieurs acteurs cytokiniques. De futures investigations seront nécessaires pour mieux préciser les liens qu'entretiennent ces différents acteurs inflammatoires.

Dans cette perspective, nous souhaitons :

- poursuivre nos analyses fonctionnelles *in vitro* en étendant le champ d'investigation à d'autres populations cellulaires purifiées dont le rôle dans la PNS a déjà été évoqué (lymphocytes, mastocytes),
- renforcer la caractérisation phénotypique des patients suivis pour PNS en exploitant les données de notre approche protéomique. Les analyses qualitative et quantitative obtenues sur les sécrétions nasales puis sur les polypes permettront de mieux définir les protéines d'intérêt susceptibles d'influencer les voies inflammatoires de la PNS en fonction du statut asthmatique des patients,
- exploiter cet outil d'analyse protéomique en proposant d'élargir l'analyse aux sécrétions nasales de sujets sains ou de sujets atteints de rhinite chronique allergique afin de comparer les voies de signalisation cellulaire,
- d'évaluer l'impact du traitement symptomatique en comparant les profils d'expression protéique au sein des sécrétions nasales avant et après utilisation d'une corticothérapie par voie générale.

De futurs travaux de recherche clinique devraient très prochainement être menés à l'échelon national pour évaluer l'efficacité de traitements combinés anti-IL-5 et anti-IL-4 dans la PNS. Nous avons été sollicités pour participer à ces études. L'accès à cette combinaison thérapeutique dans le cadre d'un essai structuré pourrait ainsi permettre d'intègrer les outils que nous avons développés en histologie, en analyse immunophénotypique et en protéomique dans le cadre d'une étude de grande envergure sur le plan fondamental et thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. Int J Epidemiol. 1999;28(4):717‑22.

2. Hosemann W, Göde U, Wagner W. Epidemiology, pathophysiology of nasal polyposis, and spectrum of endonasal sinus surgery. Am J Otolaryngol. 1994;15(2):85‑98.

3. Klossek JM, Neukirch F, Pribil C, Jankowski R, Serrano E, Chanal I, et al. Prevalence of nasal polyposis in France: a cross-sectional, case-control study. Allergy. 2005;60(2):233‑7.

4. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. Rhinol Suppl. 2012;(23):3 p preceding table of contents, 1‑298.

5. Lildholdt T, Fogstrup J, Gammelgaard N, Kortholm B, Ulsoe C. Surgical versus medical treatment of nasal polyps. Acta Otolaryngol (Stockh). 1988;105(1-2):140‑3.

6. Lund VJ, Mackay IS. Staging in rhinosinusitus. Rhinology. 1993;31(4):183‑4.

7. Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. Allergy Asthma Proc Off J Reg State Allergy Soc. 1996;17(5):231‑6.

8. 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. 2010;127(3):91‑6.

9. Hessler JL, Piccirillo JF, Fang D, Vlahiotis A, Banerji A, Levitt RG, et al. Clinical outcomes of chronic rhinosinusitis in response to medical therapy: results of a prospective study. Am J Rhinol. 2007;21(1):10‑8.

10. Videler WJM, van Drunen CM, van der Meulen FW, Fokkens WJ. Radical surgery: effect on quality of life and pain in chronic rhinosinusitis. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 2007;136(2):261‑7.

11. Wabnitz DAM, Nair S, Wormald PJ. Correlation between preoperative symptom scores, quality-of-life questionnaires, and staging with computed tomography in patients with chronic rhinosinusitis. Am J Rhinol. 2005;19(1):91‑6.

12. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, Aria Workshop Group, World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. J Allergy Clin Immunol. 2001;108(5 Suppl):S147‑334.

13. Larsen K. The clinical relationship of nasal polyps to asthma. Allergy Asthma Proc Off J Reg State Allergy Soc. 1996;17(5):243‑9.

14. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(4):607‑14.

15. Kowalski ML, Pawliczak R, Wozniak J, Siuda K, Poniatowska M, Iwaszkiewicz J, et al. Differential metabolism of arachidonic acid in nasal polyp epithelial cells cultured from aspirin-sensitive and aspirin-tolerant patients. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161(2 Pt 1):391‑8.

16. Misso NLA, Thompson PJ. Oxidative stress and antioxidant deficiencies in asthma: potential modification by diet. Redox Rep Commun Free Radic Res. 2005;10(5):247‑55.

17. Xiao C, Puddicombe SM, Field S, Haywood J, Broughton-Head V, Puxeddu I, et al. Defective epithelial barrier function in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2011;128(3):549‑56.e1‑12.

18. Rugina M, Serrano E, Klossek JM, Crampette L, Stoll D, Bebear JP, et al. Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience. Rhinology. 2002;40(2):75‑9.

19. Braun H, Buzina W, Freudenschuss K, Beham A, Stammberger H. « Eosinophilic fungal rhinosinusitis »: a common disorder in Europe? The Laryngoscope. 2003;113(2):264‑9.

20. Shin S-H, Lee Y-H, Jeon C-H. Protease-dependent activation of nasal polyp epithelial cells by airborne fungi leads to migration of eosinophils and neutrophils. Acta Otolaryngol (Stockh). 2006;126(12):1286‑94.

21. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang M-J, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. Annu Rev Physiol. 2011;73:479‑501.

22. Ebbens FA, Georgalas C, Luiten S, van Drunen CM, Badia L, Scadding GK, et al. The effect of topical amphotericin B on inflammatory markers in patients with chronic rhinosinusitis: a multicenter randomized controlled study. The Laryngoscope. 2009;119(2):401‑8.

23. Kohlmeier JE, Woodland DL. Immunity to respiratory viruses. Annu Rev Immunol. 2009;27:61‑82.

24. Wood AJ, Antoszewska H, Fraser J, Douglas RG. Is chronic rhinosinusitis caused by persistent respiratory virus infection? Int Forum Allergy Rhinol. 2011;1(2):95‑100.

25. Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma? J Allergy Clin Immunol. 2010;125(6):1202‑5.

26. Jackson DJ, Johnston SL. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(6):1178‑87; quiz 1188‑9.

27. Benninger M, Brook I, Bernstein JM, Casey JR, Roos K, Marple B, et al. Bacterial interference in upper respiratory tract infections: a systematic review. Am J Rhinol Allergy. 2011;25(2):82‑8.

28. Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch SV, Kolter R. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. mBio. 2010;1(3).

29. Niederfuhr A, Kirsche H, Riechelmann H, Wellinghausen N. The bacteriology of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2009;135(2):131‑6.

30. Kim HJ, Lee K, Yoo J-B, Song J-W, Yoon J-H. Bacteriological findings and antimicrobial susceptibility in chronic sinusitis with nasal polyp. Acta Otolaryngol (Stockh). 2006;126(5):489‑97.

31. Larson DA, Han JK. Microbiology of sinusitis: does allergy or endoscopic sinus surgery affect the microbiologic flora? Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;19(3):199‑203.

32. Van Zele T, Gevaert P, Watelet J-B, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, et al. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol. 2004;114(4):981‑3.

33. Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metze D, Rudack C. Staphylococcus aureus invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. Allergy. 2010;65(11):1430‑7.

34. Bachert C, Zhang N, Patou J, van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2008;8(1):34‑8.

35. Patou J, Gevaert P, Van Zele T, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2008;121(1):110‑5.

36. Ba L, Zhang N, Meng J, Zhang J, Lin P, Zhou P, et al. The association between bacterial colonization and inflammatory pattern in Chinese chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps. Allergy. 2011;66(10):1296‑303.

37. Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol. 2007;19(6):711‑20.

38. Laudien M, Dressel S, Harder J, Gläser R. Differential expression pattern of antimicrobial peptides in nasal mucosa and secretion. Rhinology. 2011;49(1):107‑11.

39. Vroling AB, Fokkens WJ, van Drunen CM. How epithelial cells detect danger: aiding the immune response. Allergy. 2008;63(9):1110‑23.

40. Beck LA, Stellato C, Beall LD, Schall TJ, Leopold D, Bickel CA, et al. Detection of the chemokine RANTES and endothelial adhesion molecules in nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 1996;98(4):766‑80.

41. Pods R, Ross D, van Hülst S, Rudack C, Maune S. RANTES, eotaxin and eotaxin-2 expression and production in patients with aspirin triad. Allergy. 2003;58(11):1165‑70.

42. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. Nat Rev Immunol. 2008;8(3):193‑204.

43. Kato A, Peters A, Suh L, Carter R, Harris KE, Chandra R, et al. Evidence of a role for B cell-activating factor of the TNF family in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2008;121(6):1385‑92, 1392.e1‑2.

44. Yao T, Kojima Y, Koyanagi A, Yokoi H, Saito T, Kawano K, et al. Eotaxin-1, -2, and -3 immunoreactivity and protein concentration in the nasal polyps of eosinophilic chronic rhinosinusitis patients. The Laryngoscope. 2009;119(6):1053‑9.

45. Liu T, Li T-L, Zhao F, Xie C, Liu A-M, Chen X, et al. Role of thymic stromal lymphopoietin in the pathogenesis of nasal polyposis. Am J Med Sci. 2011;341(1):40‑7.

46. Claeys S, De Belder T, Holtappels G, Gevaert P, Verhasselt B, Van Cauwenberge P, et al. Macrophage mannose receptor in chronic sinus disease. Allergy. 2004;59(6):606‑12.

47. Poposki JA, Uzzaman A, Nagarkar DR, Chustz RT, Peters AT, Suh LA, et al. Increased expression of the chemokine CCL23 in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2011;128(1):73‑81.e4.

48. Peterson S, Poposki JA, Nagarkar DR, Chustz RT, Peters AT, Suh LA, et al. Increased expression of CC chemokine ligand 18 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2012;129(1):119‑27.e1‑9.

49. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(2 Suppl 2):S73‑80.

50. Pawankar R, Lee KH, Nonaka M, Takizawa R. Role of mast cells and basophils in chronic rhinosinusitis. Clin Allergy Immunol. 2007;20:93‑101.

51. Xue L, Gyles SL, Wettey FR, Gazi L, Townsend E, Hunter MG, et al. Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2005;175(10):6531‑6.

52. 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. 2006;61(11):1280‑9.

53. Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD, Galin FS, et al. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. Nat Med. 2006;12(3):317‑23.

54. Ayers CM, Schlosser RJ, O'Connell BP, Atkinson C, Mulligan RM, Casey SE, et al. Increased presence of dendritic cells and dendritic cell chemokines in the sinus mucosa of chronic rhinosinusitis with nasal polyps and allergic fungal rhinosinusitis. Int Forum Allergy Rhinol. 2011;1(4):296‑302.

55. Cerutti A, Chen K, Chorny A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. Annu Rev Immunol. 2011;29:273‑93.

56. Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C. Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens. Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol. 2007;37(12):1840‑7.

57. Suh K-S, Park H-S, Nahm D-H, Kim Y-K, Lee Y-M, Park K. Role of IgG, IgA, and IgE antibodies in nasal polyp tissue: their relationships with eosinophilic infiltration and degranulation. J Korean Med Sci. 2002;17(3):375‑80.

58. Tomassini M, Tsicopoulos A, Tai PC, Gruart V, Tonnel AB, Prin L, et al. Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. J Allergy Clin Immunol. 1991;88(3 Pt 1):365‑75.

59. Gevaert P, Holtappels G, Johansson SGO, Cuvelier C, Cauwenberge P, Bachert C. Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to Staphylococcus aureus enterotoxins in nasal polyp tissue. Allergy. 2005;60(1):71‑9.

60. Shen Y, Tang X-Y, Yang Y-C, Ke X, Kou W, Pan C-K, et al. Impaired balance of Th17/Treg in patients with nasal polyposis. Scand J Immunol. 2011;74(2):176‑85.

61. Roongrotwattanasiri K, Pawankar R, Kimura S, Mori S, Nonaka M, Yagi T. Decreased Expression of FOXP3 in Nasal Polyposis. Allergy Asthma Immunol Res. 2012;4(1):24‑30.

62. Bachert C, Zhang N, van Zele T, Gevaert P. Chronic rhinosinusitis: from one disease to different phenotypes. Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol. 2012;23 Suppl 22:2‑4.

63. Cao P-P, Li H-B, Wang B-F, Wang S-B, You X-J, Cui Y-H, et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese. J Allergy Clin Immunol. sept 2009;124(3):478‑84, 484.e1‑2.

64. Shaw JL, Fakhri S, Citardi MJ, Porter PC, Corry DB, Kheradmand F, et al. IL-33-responsive innate lymphoid cells are an important source of IL-13 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Am J Respir Crit Care Med. 2013;188(4):432‑9.

65. Miljkovic D, Bassiouni A, Cooksley C, Ou J, Hauben E, Wormald P-J, et al. Association between group 2 innate lymphoid cells enrichment, nasal polyps and allergy in chronic rhinosinusitis. Allergy. 2014;69(9):1154‑61.

66. Sun D-I, Joo Y-H, Auo H-J, Kang J-M. Clinical significance of eosinophilic cationic protein levels in nasal secretions of patients with nasal polyposis. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg. 2009;266(7):981‑6.

67. Bachert C, Wagenmann M, Hauser U, Rudack C. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. J Allergy Clin Immunol. 1997;99(6 Pt 1):837‑42.

68. Soler ZM, Sauer DA, Mace J, Smith TL. Relationship between clinical measures and histopathologic findings in chronic rhinosinusitis. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 2009;141(4):454‑61.

69. Couto LGF, Fernades AM, Brandão DF, Santi Neto D de, Valera FCP, Anselmo-Lima WT. Histological aspects of rhinosinusal polyps. Braz J Otorhinolaryngol. 2008;74(2):207‑12.

70. Berger G, Kattan A, Bernheim J, Ophir D. Polypoid mucosa with eosinophilia and glandular hyperplasia in chronic sinusitis: a histopathological and immunohistochemical study. The Laryngoscope. 2002;112(4):738‑45.

71. Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, De Ruyck N, et al. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2009;124(2):253‑9, 259.e1‑2.

72. Van Bruaene N, Bachert C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2011;11(1):8‑11.

73. Watelet JB, Bachert C, Claeys C, Van Cauwenberge P. Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis. Allergy. 2004;59(1):54‑60.

74. Kanoh S, Tanabe T, Rubin BK. IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells. Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol. 2011;41(12):1747‑56.

75. Crampette L, Serrano E, Klossek JM, Rugina M, Rouvier P, Peynègre R, et al. [French multicenter prospective epidemiologic study (ORLI Group) of allergic and lung diseases associated with nasal polyposis]. Rev Laryngol - Otol - Rhinol. 2001;122(4):231‑6.

76. Molnar-Gabor E, Endreffy E, Rozsasi A. HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 genotypes in patients with nasal polyposis. The Laryngoscope. 2000;110(3 Pt 1):422‑5.

77. Luxenberger W, Posch U, Berghold A, Hofmann T, Lang-Loidolt D. HLA patterns in patients with nasal polyposis. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg. 2000;257(3):137‑9.

78. Fritz SB, Terrell JE, Conner ER, Kukowska-Latallo JF, Baker JR. Nasal mucosal gene expression in patients with allergic rhinitis with and without nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2003;112(6):1057‑63.

79. Benítez P, Alobid I, de Haro J, Berenguer J, Bernal-Sprekelsen M, Pujols L, et al. A short course of oral prednisone followed by intranasal budesonide is an effective treatment of severe nasal polyps. The Laryngoscope. 2006;116(5):770‑5.

80. Vaidyanathan S, Barnes M, Williamson P, Hopkinson P, Donnan PT, Lipworth B. Treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis with oral steroids followed by topical steroids: a randomized trial. Ann Intern Med. 2011;154(5):293‑302.

81. Jankowski R, Pigret D, Decroocq F. Comparison of functional results after ethmoidectomy and nasalization for diffuse and severe nasal polyposis. Acta Otolaryngol (Stockh). 1997;117(4):601‑8.

82. Devars du Mayne M, Prulière-Escabasse V, Zerah-Lancner F, Coste A, Papon J-F. Polypectomy compared with ethmoidectomy in the treatment of nasal polyposis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;137(2):111‑7.

83. Dalziel K, Stein K, Round A, Garside R, Royle P. Systematic review of endoscopic sinus surgery for nasal polyps. Health Technol Assess Winch Engl. 2003;7(17):iii, 1‑159.

84. Hopkins C, Browne JP, Slack R, Lund V, Topham J, Reeves B, et al. The national comparative audit of surgery for nasal polyposis and chronic rhinosinusitis. Clin Otolaryngol Off J ENT-UK Off J Neth Soc Oto-Rhino-Laryngol Cervico-Facial Surg. 2006;31(5):390‑8.

85. Mortuaire G, Bahij J, Maetz B, Chevalier D. Lund-Mackay score is predictive of bleeding in ethmoidectomy for nasal polyposis. Rhinology. 2008;46(4):285‑8.

86. Ebbens FA, Georgalas C, Fokkens WJ. Fungus as the cause of chronic rhinosinusitis: the case remains unproven. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2009;17(1):43‑9.

87. Van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, Beule A, Wormald PJ, Mayr S, et al. Oral steroids and doxycycline: two different approaches to treat nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(5):1069‑76.e4.

88. Schalek P, Petrás P, Klement V, Hahn A. Short-term antibiotics treatment in patients with nasal polyps and enterotoxins producing Staphylococcus aureus strains. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg. 2009;266(12):1909‑13.

89. Yamada T, Fujieda S, Mori S, Yamamoto H, Saito H. Macrolide treatment decreased the size of nasal polyps and IL-8 levels in nasal lavage. Am J Rhinol. 2000;14(3):143‑8.

90. Haye R, Aanesen JP, Burtin B, Donnelly F, Duby C. The effect of cetirizine on symptoms and signs of nasal polyposis. J Laryngol Otol. 1998;112(11):1042‑6.

91. Schäper C, Noga O, Koch B, Ewert R, Felix SB, Gläser S, et al. Anti-inflammatory properties of montelukast, a leukotriene receptor antagonist in patients with asthma and nasal polyposis. J Investig Allergol Clin Immunol. 2011;21(1):51‑8.

92. Stewart RA, Ram B, Hamilton G, Weiner J, Kane KJ. Montelukast as an adjunct to oral and inhaled steroid therapy in chronic nasal polyposis. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 2008;139(5):682‑7.

93. Kowalski ML, Cieślak M, Pérez-Novo CA, Makowska JS, Bachert C. Clinical and immunological determinants of severe/refractory asthma (SRA): association with Staphylococcal superantigen-specific IgE antibodies. Allergy. 2011;66(1):32‑8.

94. Pinto JM, Mehta N, DiTineo M, Wang J, Baroody FM, Naclerio RM. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of anti-IgE for chronic rhinosinusitis. Rhinology. 2010;48(3):318‑24.

95. Gevaert P, Calus L, Van Zele T, Blomme K, De Ruyck N, Bauters W, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(1):110‑6.e1.

96. Gevaert P, Hellman C, Lundblad L, Lundahl J, Holtappels G, van Cauwenberge P, et al. Differential expression of the interleukin 5 receptor alpha isoforms in blood and tissue eosinophils of nasal polyp patients. Allergy. 2009;64(5):725‑32.

97. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. N Engl J Med. 2014;371(13):1198‑207.

98. Lim H, Nair P. Efficacy and safety of reslizumab in patients with moderate to severe eosinophilic asthma. Expert Rev Respir Med. 2015;1‑8.

99. Gevaert P, Lang-Loidolt D, Lackner A, Stammberger H, Staudinger H, Van Zele T, et al. Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. J Allergy Clin Immunol. 2006;118(5):1133‑41.

100. Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, Van Steen K, Van Zele T, Acke F, et al. Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol. 2011;128(5):989‑95.e1‑8.

101. Van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C. Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2011;128(4):728‑32.

102. Akdis CA, Bachert C, Cingi C, Dykewicz MS, Hellings PW, Naclerio RM, et al. 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. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(6):1479‑90.

103. Polzehl D, Moeller P, Riechelmann H, Perner S. Distinct features of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. Allergy. 2006;61(11):1275‑9.

104. Bachert C, Zhang N. Chronic rhinosinusitis and asthma: novel understanding of the role of IgE « above atopy ». J Intern Med. 2012;272(2):133‑43.

105. Bachert C, Zhang N, Holtappels G, De Lobel L, van Cauwenberge P, Liu S, et al. Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in nasal polyps is associated with comorbid asthma. J Allergy Clin Immunol. 2010;126(5):962‑8, 968.e1‑6.

106. Zhang N, Van Zele T, Perez-Novo C, Van Bruaene N, Holtappels G, DeRuyck N, et al. Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. J Allergy Clin Immunol. 2008;122(5):961‑8.

107. Sil A, Mackay I, Rowe-Jones J. Assessment of predictive prognostic factors for functional endoscopic sinus surgery in a 5-year prospective outcome study. Am J Rhinol. 2007;21(3):289‑96.

108. Smith TL, Litvack JR, Hwang PH, Loehrl TA, Mace JC, Fong KJ, et al. Determinants of outcomes of sinus surgery: a multi-institutional prospective cohort study. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 2010;142(1):55‑63.

109. Mendelsohn D, Jeremic G, Wright ED, Rotenberg BW. Revision rates after endoscopic sinus surgery: a recurrence analysis. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2011;120(3):162‑6.

110. Matsuwaki Y, Ookushi T, Asaka D, Mori E, Nakajima T, Yoshida T, et al. Chronic rhinosinusitis: risk factors for the recurrence of chronic rhinosinusitis based on 5-year follow-up after endoscopic sinus surgery. Int Arch Allergy Immunol. 2008;146 Suppl 1:77‑81.

111. Bonfils P, Malinvaud D. Influence of allergy in patients with nasal polyposis after endoscopic sinus surgery. Acta Otolaryngol (Stockh). 2008;128(2):186‑92.

112. Rudmik L, Mace JC, Smith TL. Smoking and endoscopic sinus surgery: does smoking volume contribute to clinical outcome. Int Forum Allergy Rhinol. 2011;1(3):145‑52.

113. Das S, Becker AM, Perakis H, Prosser JD, Kountakis SE. The effects of smoking on short-term quality of life outcomes in sinus surgery. The Laryngoscope. 2007;117(12):2229‑32.

114. Oyer SL, Mulligan JK, Psaltis AJ, Henriquez OA, Schlosser RJ. Cytokine correlation between sinus tissue and nasal secretions among chronic rhinosinusitis and controls. The Laryngoscope. 2013;123(12):E72‑8.

115. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, Vrtis RF, Gern JE, Kita H, et al. Decreased expression of membrane IL-5 receptor alpha on human eosinophils: I. Loss of membrane IL-5 receptor alpha on airway eosinophils and increased soluble IL-5 receptor alpha in the airway after allergen challenge. J Immunol Baltim Md 1950. 2002;169(11):6452‑8.

116. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, Vrtis RF, Gern JE, Kita H, et al. Decreased expression of membrane IL-5 receptor alpha on human eosinophils: II. IL-5 down-modulates its receptor via a proteinase-mediated process. J Immunol Baltim Md 1950. 2002;169(11):6459‑66.

117. Gregory B, Kirchem A, Phipps S, Gevaert P, Pridgeon C, Rankin SM, et al. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. J Immunol Baltim Md 1950. 2003;170(11):5359‑66.

118. Farahani R, Sherkat R, Hakemi MG, Eskandari N, Yazdani R. Cytokines (interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and asthma. Adv Biomed Res. 2014;3:127.

119. Temann U-A, Ray P, Flavell RA. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. J Clin Invest. 2002;109(1):29‑39.

120. Louahed J, Zhou Y, Maloy WL, Rani PU, Weiss C, Tomer Y, et al. Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils. Blood. 2001;97(4):1035‑42.

121. McLane MP, Haczku A, van de Rijn M, Weiss C, Ferrante V, MacDonald D, et al. Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998;19(5):713‑20.

122. Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renauld JC, Levitt RC, et al. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000;22(6):649‑56.

123. Tsicopoulos A, Shimbara A, de Nadai P, Aldewachi O, Lamblin C, Lassalle P, et al. Involvement of IL-9 in the bronchial phenotype of patients with nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol. 2004;113(3):462‑9.

124. Shimbara A, Christodoulopoulos P, Soussi-Gounni A, Olivenstein R, Nakamura Y, Levitt RC, et al. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2000;105(1 Pt 1):108‑15.

125. Gounni AS, Gregory B, Nutku E, Aris F, Latifa K, Minshall E, et al. Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. Blood. 2000;96(6):2163‑71.

126. Petit-Frere C, Dugas B, Braquet P, Mencia-Huerta JM. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. Immunology. 1993;79(1):146‑51.

127. Little FF, Cruikshank WW, Center DM. Il-9 stimulates release of chemotactic factors from human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001;25(3):347‑52.

128. Legrand F, Driss V, Delbeke M, Loiseau S, Hermann E, Dombrowicz D, et al. Human eosinophils exert TNF-α and granzyme A-mediated tumoricidal activity toward colon carcinoma cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2010;185(12):7443‑51.

129. Nissim Ben Efraim AH, Munitz A, Sherman Y, Mazer BD, Levi-Schaffer F, Eliashar R. Efficient purification of eosinophils from human tissues: a comparative study. J Immunol Methods. 2009;343(2):91‑6.

130. Payne SC, Early SB, Huyett P, Han JK, Borish L, Steinke JW. Evidence for distinct histologic profile of nasal polyps with and without eosinophilia. The Laryngoscope. 2011;121(10):2262‑7.

131. Sano K, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Tamura G, Shirato K. CD44 expression on blood eosinophils is a novel marker of bronchial asthma. Int Arch Allergy Immunol. 1997;114 Suppl 1:67‑71.

132. Lantero S, Alessandri G, Spallarossa D, Scarso L, Rossi GA. LFA-1 expression by blood eosinophils is increased in atopic asthmatic children and is involved in eosinophil locomotion. Eur Respir J. 1998;12(5):1094‑8.

133. Jahnsen FL, Haraldsen G, Aanesen JP, Haye R, Brandtzaeg P. Eosinophil infiltration is related to increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 in nasal polyps. Am J Respir Cell Mol Biol. 1995;12(6):624‑32.

134. Simões T, Charro N, Blonder J, Faria D, Couto FM, Chan KC, et al. Molecular profiling of the human nasal epithelium: A proteomics approach. J Proteomics. 2011;75(1):56‑69.

135. Min-man W, Hong S, Zhi-qiang X, Xue-ping F, Chang-qi L, Dan L. Differential proteomic analysis of nasal polyps, chronic sinusitis, and normal nasal mucosa tissues. Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg. 2009;141(3):364‑8.

136. Upton DC, Welham NV, Kuo JS, Walker JW, Pasic TR. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a proteomic analysis. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2011;120(12):780‑6.

137. Al Badaai Y, DiFalco MR, Tewfik MA, Samaha M. Quantitative proteomics of nasal mucus in chronic sinusitis with nasal polyposis. J Otolaryngol - Head Neck Surg J Oto-Rhino-Laryngol Chir Cervico-Faciale. 2009;38(3):381‑9.

138. Rudack C, Prehm P, Stoll W, Maune S. Extracellular matrix components in nasal polyposis. Acta Otolaryngol (Stockh). 2003;123(5):643‑7.

139. Bellei E, Bergamini S, Monari E, Fantoni LI, Cuoghi A, Ozben T, et al. High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins. Amino Acids. 2011;40(1):145‑56.

140. Fernández C, Santos HM, Ruíz-Romero C, Blanco FJ, Capelo-Martínez J-L. A comparison of depletion versus equalization for reducing high-abundance proteins in human serum. Electrophoresis. 2011;32(21):2966‑74.

141. Davidsson A, Hellquist HB. The so-called « allergic » nasal polyp. ORL J Oto-Rhino-Laryngol Its Relat Spec. 1993;55(1):30‑5.

142. Nakajima H, Sano H, Nishimura T, Yoshida S, Iwamoto I. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. J Exp Med. 1994;179(4):1145‑54.

143. Dallaire M-J, Ferland C, Lavigne S, Chakir J, Laviolette M. Migration through basement membrane modulates eosinophil expression of CD44. Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol. 2002;32(6):898‑905.

144. Johansson MW, Gunderson KA, Kelly E a. B, Denlinger LC, Jarjour NN, Mosher DF. Anti-IL-5 attenuates activation and surface density of β(2) -integrins on circulating eosinophils after segmental antigen challenge. Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol. 2013;43(3):292‑303.

145. Matsumoto K, Appiah-Pippim J, Schleimer RP, Bickel CA, Beck LA, Bochner BS. CD44 and CD69 represent different types of cell-surface activation markers for human eosinophils. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998;18(6):860‑6.

146. Johansson MW, Mosher DF. Integrin activation States and eosinophil recruitment in asthma. Front Pharmacol. 2013;4:33.

147. Lesley J, Hyman R. CD44 structure and function. Front Biosci J Virtual Libr. 1998;3:d616‑30.

148. Nopp A, Lundahl J, Halldén G. Quantitative, rather than qualitative, differences in CD69 upregulation in human blood eosinophils upon activation with selected stimuli. Allergy. 2000;55(2):148‑56.

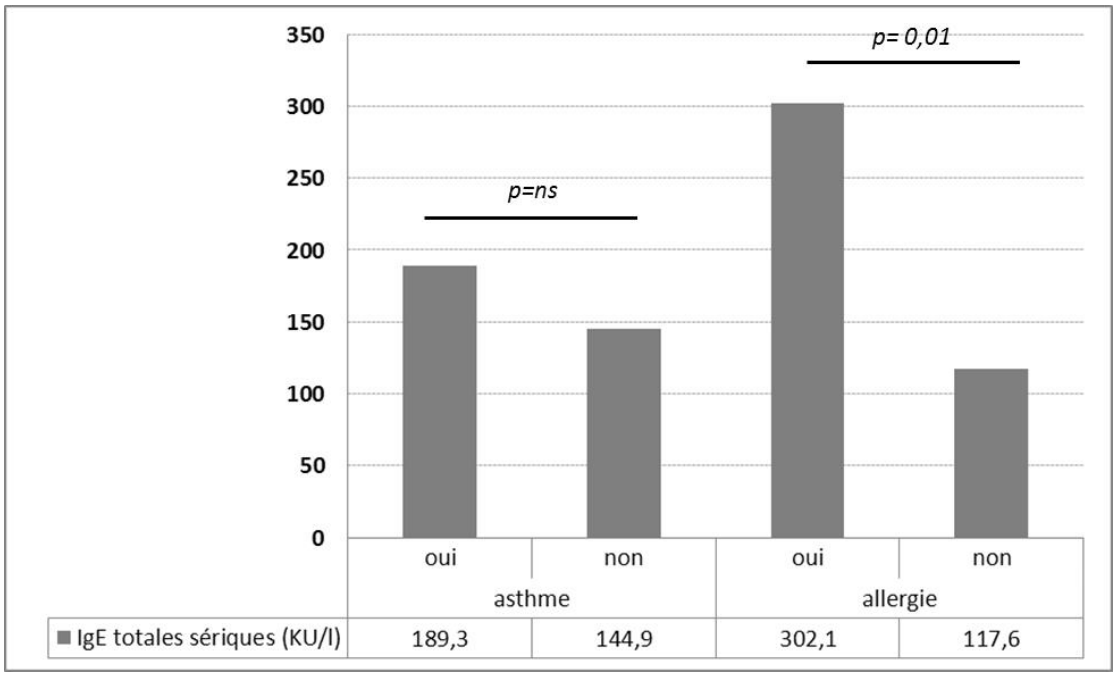
149. Hellman C, Halldén G, Hylander B, Lundahl J. Regulation of the interleukin-5 receptor alpha-subunit on peripheral blood eosinophils from healthy subjects. Clin Exp Immunol. 2003;131(1):75‑81.

150. Poulin LF, Habran C, Stordeur P, Goldman M, McKenzie A, Van Snick J, et al. Interleukin-9 stimulates the production of interleukin-5 in CD4+ T cells. Eur Cytokine Netw. 2005;16(3):233‑9.

151. Ikeda K, Shiozawa A, Ono N, Kusunoki T, Hirotsu M, Homma H, et al. Subclassification of chronic rhinosinusitis with nasal polyp based on eosinophil and neutrophil. The Laryngoscope. 2013;123(11):E1‑9.

ANNEXES

Annexe 1 : Analyse complémentaire des taux sériques en IgE totales en fonction du statut clinique.
Les taux sériques en IgE totales n'étaient pas différents entre sujets asthmatiques et non asthmatiques (p=ns (non signigicatif)). Les taux sériques en IgE totales étaient plus élevés chez les patients allergiques (p=0,01).



Annexe 2 : Analyse comparative des marqueurs inflammatoires selon le statut allergique des patients.
Les taux des différents paramètres mesurés n'étaient pas différents selon le statut allergique des patients (a: sérique, b: sécrétions nasales, c: polype).

	Allergique	Non allergique	*p*
EOs (/mm^3)[a]	529	527	0,58
IgE totales (KU/l)[b]	44,2	31,6	0,23
IL-5(pg/ml)[b]	34,6	25,2	0,52
EDN(ng/ml)[b]	410,5	375,6	0,76
IL-9(pg/ml)[c]	28	35	0,24

Auteur : MORTUAIRE Geoffrey
Thèse de doctorat
Date de soutenance : 20 Mai 2015
Titre de la thèse : Modulation des mécanismes inflammatoires impliquant les polynucléaires éosinophiles au cours de la polypose naso-sinusienne associée à un asthme
Ecole doctorale Biologie-Santé, Lille, 2015.

Résumé :

Contexte : La polypose naso-sinusienne (PNS) est une maladie inflammatoire chronique multifactorielle dont l'étiologie reste imprécise. Les acteurs de l'immunité innée et acquise sont diversement impliqués avec un rôle central joué par l'éosinophile (EO). L'asthme associé à la PNS est un facteur de résistance à la corticothérapie constituant à l'heure actuelle la seule option thérapeutique médicale.

Objectifs : Caractériser sur le plan histologique, biologique et cellulaire les patients atteints de PNS afin de définir des profils phénotypiques inflammatoires en relation avec l'asthme et de préciser les mécanismes d'immuno-modulation de l'EO.

Matériel: Une étude prospective était menée incluant les patients atteints de PNS réfractaires au traitement médical. Etaient réalisés un dosage des marqueurs d'inflammation sur les sécrétions nasales et les polypes, une analyse histologique du polype sous microscopie optique et une analyse cytométrique des récepteurs d'adhérence et d'activation sur les EOs purifiés sanguins et tissulaires. Ces paramètres étaient comparés à la présence d'un asthme.

Résultats: Une classification histologique des polypes en 3 sous-types était établie (œdémateux, fibreux et intermédiaire). Il n'existait pas de corrélation entre cette classification et le statut clinique. L'asthme était associé à une plus forte éosinophilie tissulaire, à la présence d'une plus forte concentration en interleukine 5 (IL-5), IgE et eosinophil derived neurotoxin (EDN) dans les sécrétions nasales et dans le polype. La domiciliation des EOs dans le polype était favorisée par une diminution de l'expression membranaire des βintégrines et du CD44 après migration tissulaire. Les analyses fonctionnelles par mise en culture d'EOs purifiés confirmaient le rôle anti-apoptique de l'IL-5 à forte concentration, renforcé chez les patients asthmatiques par la présence de l'IL-9 induisant l'expression membranaire de l'IL-5Rα.

Discussion: Ces résultats confirment le rôle majeur de l'EO en particulier chez les patients asthmatiques. Le profil inflammatoire (IL-5, IgE, IL-9) conditionne la domiciliation tissulaire des EOs en modulant l'expression des protéines d'adhérence et d'interaction. Il influence aussi la survie tissulaire des EOs en contrebalançant une diminution d'expression de l'IL-5Rα IL-5 dépendante par une synergie d'action IL-5/IL-9 anti-apoptotique.

Conclusion: L'environnement cytokinique dans la PNS détermine des profils phénotypiques corrélés à la présence d'un asthme. La réaction inflammatoire dominée par l'EO est tributaire de mécanismes intriqués d'immuno-modulation. L'analyse de ces mécanismes permet de comprendre l'efficacité relative des thérapies ciblées anti IL-5 actuellement testées.

Mots clés : éosinophile, polypose naso-sinusienne, interleukine 5, interleukine 9, apoptose.

Composition du jury :

Président :	Mme le Professeur Monique capron
Assesseurs :	Mr le Professeur André Coste
	Mme le Docteur Valérie Gouilleux
	Mr le Docteur Jean-François Papon
Co-directeur de Thèse :	Mr le Professeur Lionel Prin
Directeur de Thèse :	Mr le Professeur Dominique Chevalier

Adresse de l'auteur : 90 rue de Besson, 59274 Marquillies
geoffrey.mortuaire@chru-lille.fr