



AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

ED 352 – Physique et Sciences de la Matière

Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille (CINaM)

Laboratoire Adhésion et Inflammation (LAI)

**Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur**

Discipline : Biophysique

**Mustapha Kamel KHELLOUFI**

---

*Physique de la dynamique mucociliaire / Dispositif d'étude  
de la migration cellulaire 3D  
Application à l'asthme et à la BPCO*

---

*Soutenue le 21/10/2015 devant le jury :*

Olivia DU ROURE	Rapporteur
Pierre-Régis BURGEL	Rapporteur
Marc JAEGER	Examineur
Philippe LE ROUZIC	Examineur
Jean-Marc DI MEGLIO	Examineur
Isabelle VACHIER	Examineur
Pascal CHANEZ	Directeur de thèse
Annie VIALLAT	Directrice de thèse



Cette oeuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 3.0 France.

# Résumé

Ce travail consiste à apporter une approche différente basée sur la physique pour l'étude des maladies respiratoires.

La première partie de cette étude concerne la dynamique mucociliaire avec une application à l'asthme sévère et la BPCO. Nous avons décrit les mécanismes physiques du transport de mucus basés sur l'analyse détaillée de l'activité ciliaire sur un épithélium reconstitué *in vitro* à partir de biopsies endo-bronchiques humaines. Nous avons montré que la distance à laquelle le mucus ou le fluide newtonien pouvaient être transportés dépendait directement du taux de couverture de l'épithélium par les touffes de cils actives. Nous avons ensuite mis en avant le rôle majeur du mucus viscoélastique sur la coordination de la direction des battements ciliaires pour un transport macroscopique. La fréquence de battement des cils joue sur la vitesse du transport du fluide. Enfin, nous avons montré que l'altération de la clairance observée dans l'asthme sévère et la BPCO est due au manque drastique de cils, tandis que les propriétés rhéologiques du mucus restent inchangées dans notre modèle.

La deuxième partie traite de la migration cellulaire dans un environnement biomimétique 3D. Nous avons mis au point un microdispositif pour la caractérisation de la migration des cellules par chimiotaxie. Nous avons validé le modèle en utilisant des cellules immunitaires soumises à des gradients de substances chimio-attractantes et un premier test du rôle inflammatoire a été effectué.



# Abstract

This work consists to bring a different approach based on physics to study the respiratory diseases.

First, study of mucociliary dynamics with an application on severe asthma and COPD was investigated. We have described the physical mechanisms of mucus transport based on the detailed analysis of ciliary activity on an *in vitro* reconstituted epithelium obtained from human endo-bronchial biopsies. We have shown that the distance at which mucus or Newtonian fluid could be transported is directly dependent on the epithelium coverage rate by the active cilia tufts. Then, we raised the important role of the viscoelastic mucus on the coordination of the ciliary beat direction for a macroscopic transport. The cilia beat frequency plays on transport fluid velocity. Finally, we have shown that altered clearance observed in severe asthma and COPD is due to the drastic lack of cilia, while the rheological properties of mucus remains unchanged in our model.

The second part of this work was to look at cell migration in a bio-mimetic 3D environment. We have developed a micro-device for characterization of cell migration by chemotaxis. We validated the model using immune cells under a chemo-attractant substances gradients and a first test of inflammatory role has been completed.



# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Dr Olivia Du ROURE et Pr Pierre-Régis BURGEL d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être rapporteur. Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de participer à la soutenance de ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Annie Viallat de m'avoir accueilli au laboratoire et de m'avoir permis de m'impliquer dans de nombreux projets, et m'accordant toute sa confiance. Je remercie également Pascal CHANEZ qui m'a coencadré pendant cette thèse et m'a permis de s'ouvrir à la médecine par les congrès et les échanges passionnants. Merci à vous deux de m'avoir accordé votre confiance et donné la liberté et les conseils qui m'ont permis de mener cette thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie également Isabelle VACHIER, sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu. Elle était plus qu'un employeur avec ses conseils et sa bienveillance. Un énorme merci à Delphine GRAS qui pour moi n'était pas seulement une collaboratrice mais une grande sœur qui a participé aussi à m'encadrer.

Un grand merci à tous les membre du LAI Alexander, Paulin, Anais, Adeline, Céline, Thomas, Yoon pour la bonne ambiance de travail. Merci aux brésiliens, José, Carlos, Djalma et Claudio et aux anciens Jules et Alex d'avoir participé aussi à cette aventure. Travailler avec vous fut un plaisir. J'y aurais gagné de très bons amis. A toute l'équipe du laboratoire, qui m'a offert beaucoup, des discussions de couloirs aux conseils scientifiques, je dis également un grand merci.

Merci à l'équipe de jeune du CINaM, Ranime, Emmanuel, Ahmad, Hichem, Emma, Sandra qui m'ont supporté pendant la fin de la thèse et bon courage

---

à vous, vous êtes les suivants. Un merci spécial à Pierre avec qui j'ai partagé cette expérience du début au LAI jusqu'à la fin au CINaM. Je remercie également Scott avec qui les discussions étaient toujours passionnantes, Astrid pour ses leçons d'espagnoles dans les couloirs du TPR2 et aux nouveaux arrivants Priya et Kamal.

Mes pensées vont aussi aux membres du projet ANR, Arnaud, Gladys, Aurélie et Dario. Les échanges et réunions à Arles, Montpellier ou Marseille furent toujours un plaisir.

Merci à ma sœur et mon beau frère de m'avoir permis d'y arriver jusque là. Le bon scientifique que je suis vous dois beaucoup. A mes parents, qui ont pris en charge de s'inquiéter à ma place et me permettent ainsi de me consacrer sereinement à ce que je fais.

Enfin, merci à Lamia pour ta présence, ton soutien et pour avoir su me remotiver quand il le fallait et pour tout le reste bien sûr. <3

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Remerciements</b>	<b>8</b>
<b>Introduction</b>	<b>17</b>
<b>I Approche physique de la dynamique mucociliaire. Application à l’asthme et à la BPCO</b>	<b>21</b>
<b>1 État de l’art</b>	<b>23</b>
1.1 L’escalator mucociliaire - fonction et structure . . . . .	24
1.1.1 Définition . . . . .	24
1.1.2 Fonction de l’escalator mucociliaire . . . . .	25
1.1.3 Structure . . . . .	25
1.2 La couche de surface des voies aériennes (ASL) . . . . .	27
1.2.1 Gel-sur-Sol . . . . .	27
1.2.2 Gel-sur-Brosse . . . . .	28
1.3 Le moteur moléculaire de propulsion (les cils) . . . . .	28
1.3.1 Cellules ciliées . . . . .	28
1.3.2 Les cils . . . . .	30
1.3.3 Composition . . . . .	30
1.3.4 Fonctionnement . . . . .	31
1.4 Force motrice et activité ciliaire . . . . .	32
1.4.1 Fonction . . . . .	32
1.4.2 Fréquence de battement . . . . .	33
1.4.3 Force . . . . .	34

# TABLE DES MATIÈRES

---

1.4.4	Dynamique . . . . .	34
1.5	Réponse du mucus : Propriétés physiques du mucus . . . . .	38
1.5.1	Propriétés rhéologiques . . . . .	38
1.5.2	Concentration . . . . .	40
1.5.3	Pression osmotique . . . . .	40
1.6	Modèles d'investigation . . . . .	41
1.6.1	Modèles humains . . . . .	42
1.6.2	Modèles animaux . . . . .	43
1.7	Anomalies de l'épithélium en pathologie humaine et altération de la clairance mucociliaire . . . . .	44
1.7.1	Asthme . . . . .	44
1.7.2	BPCO . . . . .	46
1.7.3	Mucoviscidose (CF) . . . . .	47
1.8	Méthodes d'évaluation de la structure et de la fonction des cils . . .	48
<b>2</b>	<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>51</b>
2.1	Matériels . . . . .	52
2.1.1	Matériels biologiques . . . . .	52
2.1.2	Instruments . . . . .	53
2.2	Méthodes . . . . .	54
2.2.1	Observation microscopique . . . . .	55
2.2.2	Méthode d'analyse . . . . .	57
<b>3</b>	<b>Résultats</b>	<b>59</b>
3.1	L'épithélium reconstitué : Notre modèle d'étude . . . . .	61
3.1.1	structure de l'épithélium . . . . .	61
3.1.2	dynamique et épaisseur . . . . .	62
3.1.3	Incidence sur les maladies . . . . .	62
3.2	Activité ciliaire . . . . .	63
3.2.1	Densité de surface des touffes de cils actives . . . . .	63
3.2.2	Fréquences de battement des cils (CBF) . . . . .	64
3.3	Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués .	66
3.3.1	Transport du mucus et des billes . . . . .	66
3.3.2	Force de poussée : organisation spatiale des touffes ciliaires et dynamique des battements des cils . . . . .	73
3.3.3	Rôle du mucus sur l'organisation de la force de poussée . . .	79

## TABLE DES MATIÈRES

---

3.3.4	Synthèse, remarques et interrogations . . . . .	81
3.4	Pathologies et clairance mucociliaire . . . . .	83
3.4.1	Pourcentage de surface de l'épithélium occupé par les touffes ciliaires actives et transport . . . . .	83
3.4.2	Fréquence de battement des ciliaire . . . . .	84
3.4.3	Mucus . . . . .	85
3.4.4	L'effet du mucus sur l'activité ciliaire . . . . .	87
3.4.5	Conclusion sur l'asthme sévère . . . . .	88
3.5	Perspectives . . . . .	89
3.6	Études parallèles réalisées en collaboration . . . . .	90
3.6.1	La mucoviscidose . . . . .	90
3.6.2	Les molécules pharmacologiques . . . . .	92
 <b>II Microdispositif d'étude de la migration cellulaire 3D par chemotaxis</b>		 <b>95</b>
<b>4</b>	<b>État de l'art</b>	<b>99</b>
4.1	Les cellules immunitaires impliquées dans l'asthme . . . . .	99
4.1.1	Les neutrophiles . . . . .	99
4.1.2	Les cellules dendritiques . . . . .	99
4.1.3	Les chimiokines . . . . .	100
4.2	Les cellules immunitaires impliquée dans la leishmaniose . . . . .	101
4.2.1	Contamination chez l'homme . . . . .	102
4.2.2	Les macrophages . . . . .	102
<b>5</b>	<b>Matériels et Méthodes micro-fluidique</b>	<b>105</b>
5.1	Matériels . . . . .	106
5.1.1	Matériels chimiques . . . . .	106
5.1.2	Matériels biologiques . . . . .	106
5.1.3	Instruments . . . . .	106
5.2	Méthodes . . . . .	107
5.2.1	Système biologique . . . . .	107
5.2.2	Fabrication du dispositif microfluidique . . . . .	108
5.2.3	Migration 3D et formation du gradient linéaire . . . . .	110
5.2.4	Microsystème commercial . . . . .	111

## TABLE DES MATIÈRES

---

5.2.5	Observation microscopique . . . . .	112
5.2.6	Analyse d'image . . . . .	112
<b>6</b>	<b>Résultats</b>	<b>113</b>
6.1	Dispositif microfluidique . . . . .	114
6.1.1	Viabilité des cellules . . . . .	114
6.1.2	Matrice extracellulaire . . . . .	115
6.1.3	Une perfusion continue . . . . .	115
6.1.4	Résultats Préliminaires . . . . .	116
6.1.5	Conclusion . . . . .	118
6.2	Dispositif commercial . . . . .	119
6.2.1	Description des expériences . . . . .	119
6.2.2	Observation . . . . .	120
6.2.3	Analyse des trajectoires . . . . .	120
6.2.4	Résultats préliminaires . . . . .	121
6.2.5	Conclusion . . . . .	122
6.2.6	Perspectives . . . . .	123
	<b>Conclusion Générale</b>	<b>125</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>129</b>
.1	Fréquences en solution . . . . .	130
.2	Chambre de culture Epithelix . . . . .	130
.3	L'effet attractif du domaine circulaire . . . . .	131
.4	Lésion dans la surface épithéliale . . . . .	131
.5	Le modèle physique . . . . .	131
.6	Différentiation . . . . .	135
.7	Cycle d'activation . . . . .	135
.8	Discussion . . . . .	137
.9	Migration des neutrophiles sous un gradient de leishmanies . . . . .	138
	<b>Bibliographie</b>	<b>165</b>

# Table des figures

1.1	L'appareil respiratoire . . . . .	24
1.2	Représentation schématique de l'épithélium des voies respiratoires .	25
1.3	Génération de cellules ciliées . . . . .	26
1.4	Représentation des deux couches qui composent la couche de surface des voies respiratoires (ASL) . . . . .	27
1.5	Gel sur brosse de la PCL . . . . .	29
1.6	Structure du l'épithélium en microscopie electronique . . . . .	29
1.7	Structure des cils . . . . .	31
1.8	L'escalator mucociliaire et le cycle du battement d'un cil . . . . .	32
1.9	Onde métachronale ciliaire observée dans les paramécie . . . . .	35
1.10	La viscosité de divers types de mucus humain . . . . .	40
1.11	La viscosité de divers types de mucus humain . . . . .	40
1.12	Le rétrécissement des bronches dans l'asthme . . . . .	44
1.13	Obstruction des bronches dans la BPCO . . . . .	46
2.1	Les étapes de la culture cellulaire du modèle ALI . . . . .	52
2.2	Image avant et après traitement avec Fiji . . . . .	58
3.1	Reconstruction 3D de l'épithélium ALI . . . . .	61
3.2	Identification de la structure de l'épithélium . . . . .	62
3.3	Quantification des cils mobiles . . . . .	64
3.4	Cycle de battement d'une touffes de cils . . . . .	65
3.5	Observation des battements cils en ALI et en immersion . . . . .	65
3.6	La corrélation entre la taille d'un domaine circulaire et la densité des cils . . . . .	67
3.7	La vitesse linéaire des billes en fonction du rayon du domaine circulaire	69
3.8	La dispersion des touffes de cils sur la surface de l'épithélium . . . .	71
3.9	Coordination sur quelques touffes ciliaires . . . . .	71
3.10	Les différents vortex utilisés dans l'étude de l'orientation des cils . .	71

## TABLE DES FIGURES

---

3.11	La corrélation entre la taille d'un domaine circulaire et la densité des cils . . . . .	73
3.12	Orientation des cils par rapport au transport du mucus . . . . .	74
3.13	La courbe de la force de poussée des cils en fonction des rayons des domaines circulaires jeunes . . . . .	76
3.14	Variation de la vitesse curvilinéaire sur des anneaux concentriques . . . . .	77
3.15	La courbe de la force de poussée des cils en fonction du rayon pour les domaines matures . . . . .	78
3.16	L'effet du mucus sur la coordination . . . . .	81
3.17	Diagrammes du pourcentage de touffes de cils actives avant et après avoir enlevé le mucus pour contrôles, AL, AS et BPCO . . . . .	83
3.18	La fréquence de battements des cils en ALI . . . . .	85
3.19	La concentration de mucus sur des cultures ALI . . . . .	86
3.20	La viscosité complexe $\eta^*$ (Pa.s) du mucus . . . . .	87
3.21	Le module élastique $G'$ (Pa) et le module visqueux $G''$ (Pa) du mucus . . . . .	87
3.22	L'effet de la pLK dans la mucoviscidose . . . . .	92
3.23	L'effet de la molécule GSK . . . . .	93
3.24	L'effet de la molécule GSK sur la densité des cils mobiles . . . . .	94
3.25	L'effet de la molécule EGTA sur la densité des cils mobiles . . . . .	94
4.1	Les voies en aval de CCR7 . . . . .	101
4.2	Image d'un phlébotome . . . . .	102
4.3	Cycle de vie du parasite de la leishmaniose . . . . .	102
5.1	Image des leishmanies en culture. . . . .	107
5.2	Schéma du dispositif microfluidique utilisé pour la migration 3D . . . . .	110
5.3	$\mu - slideChemotaxis^{3D}$ . . . . .	112
5.4	Image avant et après traitement avec Fiji . . . . .	112
6.1	Les étapes d'injection du mélange matrice-cellules . . . . .	115
6.2	Le mélange matrice-cellules après polymérisation de la matrice . . . . .	116
6.3	Séquences de la migration d'une cellule dendritique . . . . .	117
6.4	Un graphique polaire de la migration des cellules dendritiques . . . . .	117
6.5	Les neutrophiles piégés à l'intérieure de la matrice de collagène . . . . .	118
6.6	Un graphique polaire de la migration des neutrophiles . . . . .	118
6.7	Schéma des expériences avec leishmanies . . . . .	120

## TABLE DES FIGURES

---

6.8	L'observation de la phagocytose . . . . .	120
6.9	Les trajectoire de 3 macrophages sur une période de 2 heures . . . . .	120
6.10	Division de la chambre centrale IBIDI en deux parties . . . . .	121
6.11	Analyse de la migration des macrophages témoins . . . . .	121
6.12	Analyse de la migration des macrophages soumis à un gradient de leishmanies . . . . .	122
13	Fréquence de battement des cils en immersion . . . . .	130
14	L'évolution de la taille du vortex attractif . . . . .	131
15	Coordination . . . . .	131
16	La structure à trois couches de la surface liquide des voies aériennes (ASL) . . . . .	132
17	Schéma de la migration des monocytes à travers la paroi endothé- liale . . . . .	136
18	Schéma des différentes couches de la peau. . . . .	136
19	Schéma des différentes couches de la peau. . . . .	136
20	Migration des neutrophiles soumis à un gradient de leishmanies . . .	138

# Liste des tableaux

2.1	Tableau de la modulation pharmacologique. . . . .	55
3.1	Tableau des caractéristiques de l'épithélium ALI . . . . .	63
3.2	Tableau détaillé des domaines circulaires . . . . .	68
3.3	Tableau de l'effet du mucus sur le pourcentage des cils mobiles . . .	88
6.1	Tableau de la migration des cellules dendritiques . . . . .	117
6.2	Tableau de la migration des neutrophiles . . . . .	118

# Introduction

Les maladies chroniques sévères respiratoires (asthme sévère, BPCO, mucoviscidose) affectent des centaines de millions de personnes dans le monde. Les traitements actuellement disponibles n'arrivent pas à jouer significativement sur l'évolution naturelle des maladies et ne ralentissent pas le déclin accéléré observé de la fonction pulmonaire. En plus des effets quotidiens de ces maladies, le coût de soin au niveau mondial dépasse les centaines de millions d'euros par jour.

Ces maladies sont associées à des anomalies morphologiques et fonctionnelles de l'épithélium bronchique et une altération de la clairance mucociliaire (processus d'évacuation du mucus par les cils). En particulier, une des conséquences d'une clairance mucociliaire modifiée est une hypersécrétion du mucus dans les voies respiratoires. L'accumulation du mucus dans les voies respiratoires est l'une des causes de l'inflammation des bronches, à l'origine du recrutement massif des cellules immunitaires dans ces maladies respiratoires. L'épithélium bronchique constitue ainsi une cible thérapeutique de choix. Les approches actuelles pour l'étude de ces maladies sont souvent médicales et/ou biologiques. Des études à l'échelle moléculaire s'intéressaient aux voies de signalisation, à la fonction moléculaire ou bien à la génétique comme dans la mucoviscidose. D'autres études à l'échelle cellulaire traitaient la morphologie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

En 1950 la physique s'est ouverte aux domaines de recherches biologiques et médicales. Cette ouverture a permis d'observer de nouveaux phénomènes, parfois grâce aux récentes avancées de la technique (comme a pu l'être la création du microscope confocal), fournir des explications innovantes aux phénomènes biologiques, étudier les fonctions dynamiques et créer de nouveaux outils de caractérisation.

Dans ce contexte, mon travail de thèse est un travail exploratoire et est financé par une bourse CIFRE (Med-Bio-Med). Il consiste à apporter une approche différente, basée sur la physique pour l'étude de ces maladies respiratoires. Pour cela, j'ai utilisé deux approches différentes. La première est la physique de la dynamique mucociliaire avec une vision du mucus, considéré comme étant un fluide complexe supporté par un épithélium cilié qui génère une assemblée de forces locales permettant de transporter le mucus. La deuxième approche consiste à mettre en place un dispositif pour la caractérisation de la migration cellulaire 3D par chemotaxis. Au cours de ma troisième année de thèse, ce projet a vu l'attribution, d'un financement étendu sur 4 ans par l'Agence Nationale pour la Recherche et la naissance d'une collaboration entre quatre laboratoires, Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille (CINaM), Adhésion et Inflammation (LAI), LCC (UM2) et la compagnie Med-Bio-Med.

Le présent manuscrit est organisé en deux parties.

La première partie porte sur l'étude de la dynamique mucociliaire avec une application à l'asthme et la BPCO. Dans un 1<sup>er</sup> temps, un état de l'art rappellera ce que l'on sait sur les voies respiratoires humaines et décrira les différents composants de l'escalator mucociliaire *i.e.* les cellules ciliées, les cils, les cellules sécrétrices et le mucus. Un point sur les différentes études sur le transport mucociliaire sera également détaillé. Pour terminer, la description des modèles expérimentaux utilisés pour l'étude des composants de l'escalator mucociliaire sera présentée ainsi qu'une description des maladies respiratoires concernées *i.e.* asthme, BPCO et mucoviscidose.

Dans un 2<sup>me</sup> temps, nos résultats seront présentés regroupant l'étude du rôle des cils dans l'escalator mucociliaire et l'étude de leur organisation et de leur coordination pour transporter le mucus que ce soit dans un contexte sain ou pathologique. Pour cela, un modèle d'épithélium reconstitué *in vitro* à partir des biopsies endo-bronchique de sujets sains et malades a été utilisé (Gras et al., 2012).

En parallèle de ce thème principal, des travaux préliminaires sur le rôle po-

## *INTRODUCTION*

---

tentiel de l'épithélium dans le recrutement et la migration de cellules inflammatoires et/ou de l'immunité a été investigué dans la deuxième partie. Pour tester les effets des marqueurs inflammatoires sécrétés dans les surnageants de l'expectoration induite ou dans les surnageants de culture de cellules épithéliales, les sécrétions seront mises en contact avec des cellules immunitaires (dendritiques / neutrophiles) confinées dans un environnement qui imite la membrane basale sous-épithéliale. Pour cela, nous avons mis au point un dispositif microfluidique développé à partir d'un modèle publié dans (Liu et al., 2009) et nous avons utilisé un autre dispositif commercial. Nous présenterons des résultats préliminaires sur les cellules dendritiques / neutrophiles et d'autres originaux sur un système macrophage / parasite sur cette étude pour la validation de ces deux systèmes bio-mimétiques.



## Première partie

# Approche physique de la dynamique mucociliaire. Application à l'asthme et à la BPCO



# Chapitre 1

## État de l'art

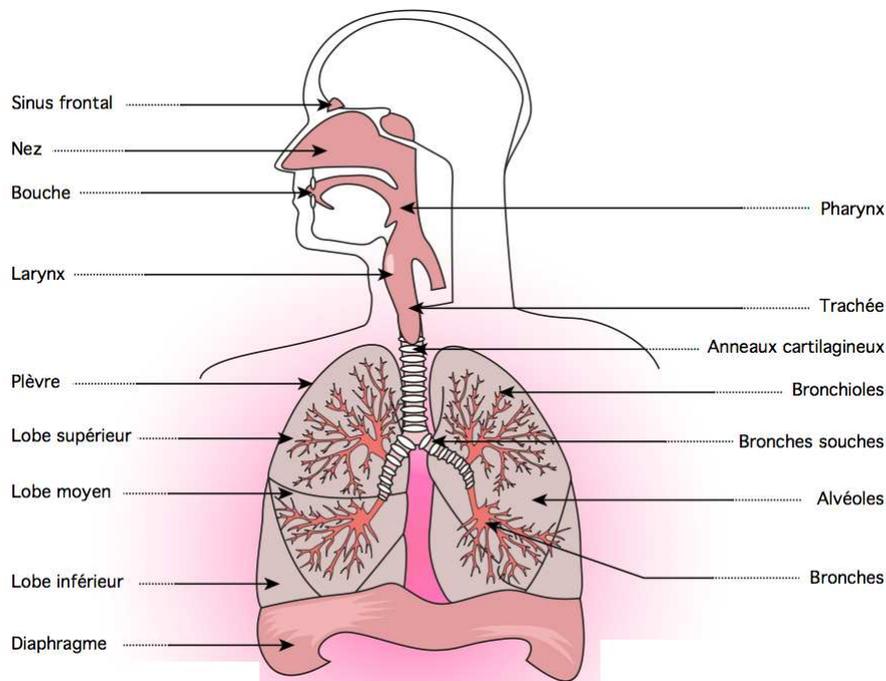


FIGURE 1.1 – Les organes des voies respiratoires.

Les voies respiratoires (voies aériennes/bronches) permettent le passage de l'air depuis le nez et la bouche jusqu'aux alvéoles pulmonaires, site d'échanges gazeux avec le sang (*figure.1.1*). Les maladies chroniques des voies respiratoires regroupent l'asthme, la BPCO (broncho-pneumopathie chronique obstructive), et la mucoviscidose. Ce sont des maladies de sévérité variable.

Les voies aériennes humaines, du nez aux alvéoles en incluant les bronches, sont recouvertes, d'une couche continue de cellules (environ  $10^{10}$ ) couvrant une superficie de  $2500 \text{ cm}^2$  appelée "épithélium de surface" (Mercer et al., 1994). Les particules inhalées et déposées dans l'appareil broncho-pulmonaire (telles que les polluants, les allergènes, les microorganismes...) sont éliminées grâce à 3 mécanismes principaux d'évacuation : la toux, la clairance alvéolaire et "**l'escalator mucociliaire**".

### 1.1 L'escalator mucociliaire - fonction et structure

#### 1.1.1 Définition

L'escalator mucociliaire est le système de clairance des voies aériennes. Il est composé d'une part des cellules caliciformes et des glandes sous-muqueuse qui produisent le mucus et d'autre part des cellules ciliées (*figure.1.2*).

Les cellules caliciformes de l'épithélium de surface et les glandes sous-muqueuse bronchiques produisent un fluide viscoélastique collant appelé mucus. En plus de ses propriétés viscoélastiques physiques et bien que composé d'eau à 95%, le mucus contient également des ions, des protéines anti-infectieuses et des glycoprotéines (les mucines) qui contribuent à l'élimination des particules et des microorganismes qui sont piégés dans les voies respiratoires.

L'autre composante principale de "l'escalator mucociliaire" est représentée par les cellules épithéliales ciliées. Les cils de ces cellules battent en permanence pour déplacer le mucus, faisant remonter les particules qui y sont piégées jusqu'à la bouche où elles seront avalées puis digérées par l'estomac. Ces mécanismes justifient le terme d'escalator mucociliaire.

#### 1.1.2 Fonction de l'escalator mucociliaire

C'est un mécanisme de défense inné crucial pour la protection des voies aériennes. Il participe à la lutte contre tous les agents nocifs inhalés au quotidien. Les particules qui gagnent le larynx sont ingérées de façon automatique pour être détruites dans le tube digestif (Crystal et al., 2008)(Knowles and Boucher, 2002). Il est estimé que 30 ml de mucus des voies respiratoires sont expectorés ou avalés par jour (Fahy and Dickey, 2010).

L'efficacité de l'escalator mucociliaire dépend de la densité et de l'activité des cils, du taux de production du mucus ainsi que de ses propriétés rhéologiques (Knowles and Boucher, 2002). Les dysfonctionnements de "l'escalator mucociliaire," ont été décrites dans la plupart des maladies chroniques des voies aériennes mais en particulier au cours de la mucoviscidose. Ils participent aux manifestations cliniques quotidiennes et aux modifications de la composition du

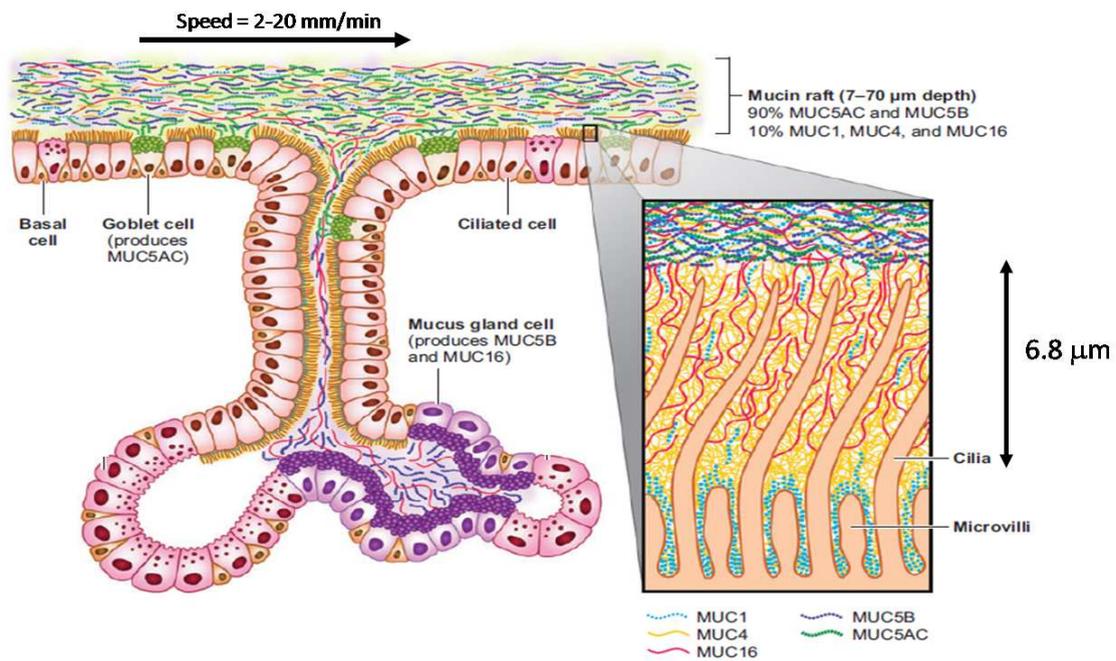


FIGURE 1.2 – (A) Représentation schématique de l'épithélium des voies respiratoires. Les cellules ciliées et les cellules calciformes (goblet cells) sur l'épithélium de surface et les glandes sous muqueuse sont montrées dans une représentation simplifiée des voies respiratoires. Les mucines constituant le mucus sont principalement MUC5AC et MUC5B (90%). Les cils sont entourés de mucines MUC16, MUC4 et MUC1 de faible poids moléculaire. *source (Hatstrup and Gendler, 2008)*

## 1.2 La couche de surface des voies aériennes (ASL)

---

microbiome respiratoire (Tilley et al., 2015).

### 1.1.3 Structure

L'escalator mucociliaire est composé d'une couche de surface fluide, "l'ASL" (Airway Surface Layer) et d'un moteur de propulsion "les cils" supportés par des cellules épithéliales. Il nécessite un couplage efficace de ces deux composants pour fonctionner.

Pour bien comprendre cet escalator, il est nécessaire de détailler une partie des cellules qui composent la muqueuse respiratoire recouvrant les voies aériennes bronchiques. Cette muqueuse est constituée d'un **épithélium** de surface reposant sur une membrane **basale** et un **chorion** sous-jacent.

L'épithélium bronchique de surface comprend quatre principaux types cellulaires : ciliées (47-73% (Staudt et al., 2014)), caliciformes (25% (Rogers, 2003)), indifférenciées intermédiaires et basales (30% (Boers et al., 1996)) formant ainsi un épithélium pseudo-stratifié (Crystal et al., 2008). Cet épithélium est appelé pseudo-stratifié, parce qu'il semble posséder en microscopie optique plusieurs couches de cellules mais en réalité, toutes les cellules reposent sur la membrane basale. Par contre, leur pôle apical n'atteint pas toujours la surface de l'épithélium (*figure.1.2*).

Les cellules basales sont à l'origine des cellules indifférenciées intermédiaires, qui se différencient ensuite en cellules ciliées et cellules caliciformes (*figure.1.3.A*), avec un rapport de 7-8 à 1 tout au long des voies aériennes (Tilley et al., 2015).

## 1.2 La couche de surface des voies aériennes (ASL)

### 1.2.1 Gel-sur-Sol

La couche de surface des voies aériennes "ASL" (*figure.1.4*) est habituellement considérée comme formée de deux couches et assimilée à un milieu biphase

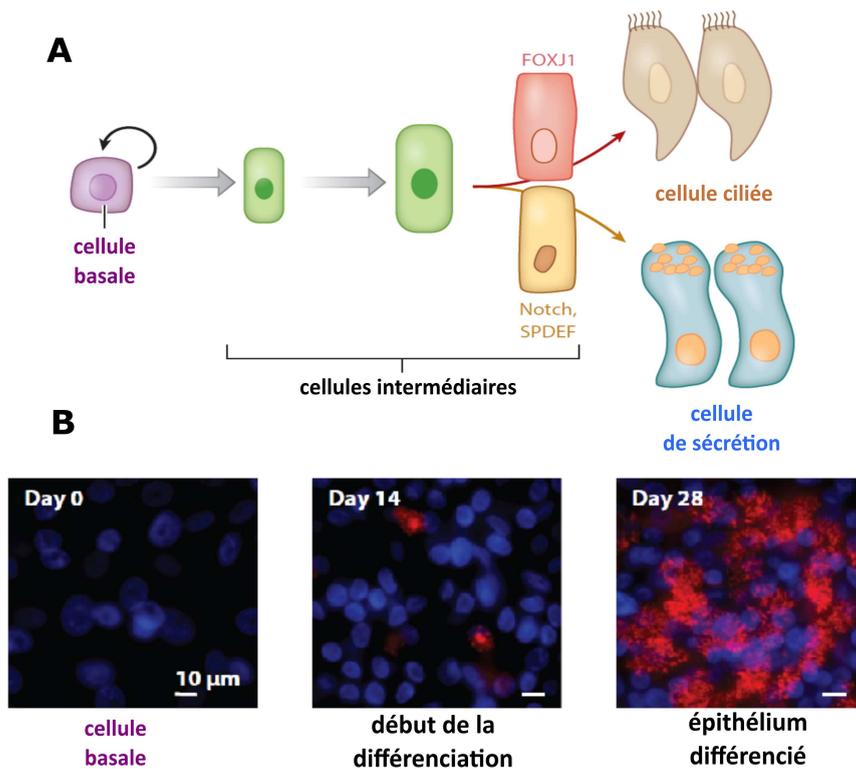


FIGURE 1.3 – La différenciation des cellules ciliées dans l'épithélium des voies respiratoires humaines. **(A)** Les voies de différenciation. Les cellules souches/progéniteurs basales sont capables d'auto-renouvellement et sont responsables de la génération de progéniteurs intermédiaires, qui selon des programmes d'activation distinctes, se différencient en cellules ciliées ou sécrétrices. La différenciation des cellules ciliées dépend du facteur de transcription (FOXJ1), tandis que la génération de cellules sécrétrices nécessite une signalisation Notch et/ou l'activation de SPDEF (SAM pointed domain-containing ETS transcription factor). **(B)** La différenciation des cellules basales des voies respiratoires humaines (jour 0) jusqu'à un épithélium des voies aériennes cilié (28 jours) dans une culture en interface air-liquide. La présence des cellules ciliées est démontrée par l'expression de  $\beta$ -tubuline IV (rouge ; visualisée par immunofluorescence). Les noyaux cellulaires sont colorés avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (bleu). *source (Tilley et al., 2015)*

## 1.2 La couche de surface des voies aériennes (ASL)

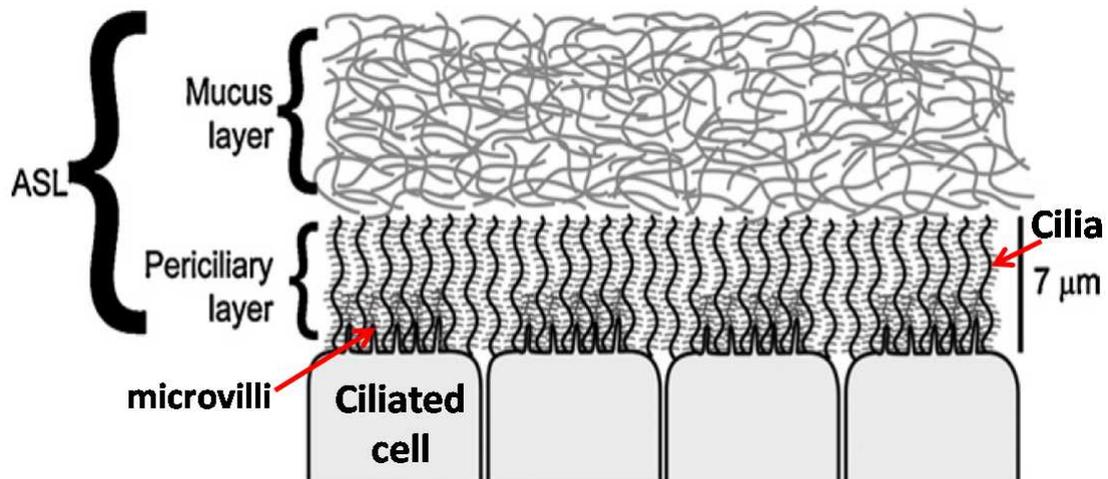


FIGURE 1.4 – Représentation des deux couches qui composent la couche de surface des voies respiratoires (ASL). Une couche supérieure de mucus, composée de mucines (MUC5B et MUC5AC) formant un gel. Une partie inférieure, ou couche périciliaire (PCL), est une structure de gel composé de mucines attachés aux cils et aux microvilli. *source : (Button and Boucher, 2008)*

composé d'une couche périciliaire (PCL ou PeriCilliary Layer) appelée aussi phase **SOL** (pour solution) et d'une couche supérieure appelée mucus ou phase **GEL**. Ce modèle est appelé "**Gel-sur-Sol**".

### 1.2.1.1 La couche périciliaire (PCL)

C'est la couche profonde dans laquelle baignent les cils. Très fluide, avec une épaisseur de 6 à 7 µm, elle fournit un environnement favorable pour le battement ciliaire. Elle est composée essentiellement de mucines de faible poids moléculaire (*figure.1.2*).

### 1.2.1.2 La couche de mucus

C'est la couche superficielle. Elle est viscoélastique, et son épaisseur varie de 7 à 70 µm *in vivo* (Winters and Yeates, 1997)(Krouse, 2001). Elle forme un revêtement continu tapissant toutes les voies respiratoires et repose sur la couche SOL. Elle est en contact avec le sommet des cils. Ce mucus est composé de plus

de 95% d'eau, 2% de glycoprotéines riches en sucre (mucines), 1% de protéines, 1% de lipides, et 1% de sels inorganiques (MATTHEWS et al., 1963)(Samet and Cheng, 1994). Les mucines (principalement MUC5AC et MUC5B, voir figure.1.2) sont des mucopolysaccharides de haut poids moléculaires avec des rayons hydrodynamiques de 150 à 200 nm (Sheehan et al., 2000)(Raynal et al., 2002). Une fois sécrétées dans la phase gel, ces mucines établissent des liaisons covalentes entre elles par des ponts disulfures (SS), ce qui augmente la viscosité du gel. La concentration normale de cette couche de mucus est de 1% (Tarran, 2004) (équivalent à 2% de solide (Button et al., 2012)).

### 1.2.2 Gel-sur-Brosse

Très récemment, ce modèle d'un gel-sur-sol a été remplacé par un modèle de gel-sur-brosse, dans lequel le liquide de la PCL (phase SOL) autour des cils des cellules ciliées est remplacé par un maillage macromoléculaire qui exclut les particules (*figure.1.5.B*).

En effet, la PCL est occupée par des mucines transmembranaires qui sont attachées aux cils, microvilli et à la surface épithéliale (Hattrup and Gendler, 2008) (*figure.1.5.A*). Ce système est décrit comme une brosse avec des mailles de l'ordre de 20 à 40 nm (Button2 et al., 2012). Les mucines de la phase GEL ont des rayons hydrodynamiques de 150 à 200 nm, soit  $\sim 5$  à 7 fois plus grand que la taille des mailles de la PCL (20 à 40 nm), ce qui explique la séparation de phase et la non pénétration de la phase gel avec des macromolécules dans la PCL. De même, les particules possédant des tailles supérieures à 40 nm restent dans la couche supérieure de mucus et ne pénètrent pas dans la PCL (*figure.1.5.B*), .

Le mucus a un triple rôle : piéger les particules, humidifier l'air inspiré (conduisant à une évaporation de la couche superficielle du mucus, déshydratation partielle et une augmentation de la viscosité) et protéger physiquement les cellules épithéliales (barrière).

## 1.2 La couche de surface des voies aériennes (ASL)

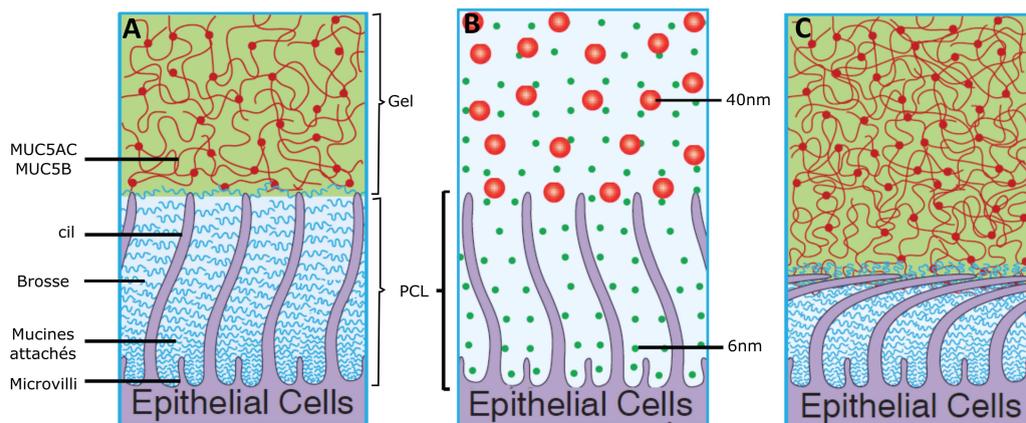


FIGURE 1.5 – Représentation schématique de (A) l’hypothèse de gel-sur-brosse de la PCL : les macromolécules attachées, telles que les mucines membranaires, forment une structure de brosse de la PCL, (B) la pénétration de petites particules fluorescente de 6 nm (Jachimska et al., 2008) (en vert) dans la PCL, alors que les particules de polystyrène de 40 nm (rouge) sont complètement exclu de la PCL. Les expériences ont été effectuées après des lavages qui éliminent le mucus, en laissant uniquement la PCL propre, pour éviter tout risque de piégeage de ces particules par le mucus (Lai et al., 2007)(Tang et al., 2009), (C) la compression des macromolécules attachées et des cils par des solutions à forte module osmotique (haute concentration). *source (Button et al., 2012)*

## 1.3 Le moteur moléculaire de propulsion (les cils)

### 1.3.1 Cellules ciliées

La cellule ciliée des voies respiratoires est le type cellulaire dominant de l'épithélium des voies aériennes et a une forme colonnaire qui s'effile vers la surface et s'appuie sur la membrane basale (*figure.1.2*). Le pourcentage de cellules ciliées augmente avec la ramification des voies respiratoires, à partir de  $47 \pm 2 \%$  dans la trachée jusqu'à  $73 \pm 1 \%$  dans le petit épithélium des voies respiratoires (Raman et al., 2009) (*figure.1.6*).

Les cellules ciliées des voies respiratoires sont des cellules différenciées terminales incapables de s'autorenouveler (*figure.1.3*) (Rawlins et al., 2007). Les cellules ciliées se renouvellent lentement avec une durée estimée de 1 à 4 mois chez l'homme (Breeze and Wheeldon, 1977).

Les progéniteurs des cellules basales dérivées se transforment en cellules ciliées complètement différenciées à la suite de l'activation du facteur de transcription forkhead box J1 (FOXJ1), avec la contribution du facteur de régulation X (RFX) (Didon et al., 2013) (Gomperts et al., 2007). FoxJ1 prend spécifiquement en charge la formation de cellules ciliées (*figure.1.3.A*).

Les cellules ciliées voisines sont reliées par des jonctions serrées, des structures multiprotéiques spécialisées qui régulent le passage des solutés et des ions à travers la barrière épithéliale et qui séparent les compartiments épithéliaux apicaux et basolatéraux, et des jonctions adhérentes base E-cadhérine qui assurent une adhérence forte de cellule à cellule (KNIGHT and HOLGATE, 2003) (Shaykhiev et al., 2011).

### 1.3.2 Les cils

Les cellules ciliées sont faciles à distinguer des autres types de cellules par la présence de cils (200 à 300 cils par cellule) sur la surface luminale (l'espace à l'intérieur des tubes). Les cils sont de 0,2 à 0,3  $\mu\text{m}$  de diamètre et varient de 6-7  $\mu\text{m}$  de longueur dans les voies aériennes supérieures jusqu'à 4  $\mu\text{m}$  dans les pe-

## 1.3 Le moteur moléculaire de propulsion (les cils)

---

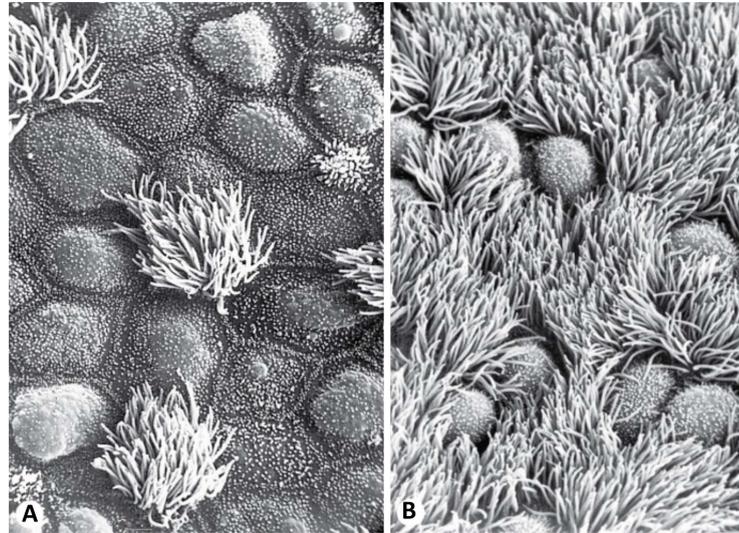


FIGURE 1.6 – Images en microscopie électronique à balayage de l'épithélium pseudostratifié cilié des voies respiratoires montrent (A) une région avec les cellules caliciformes qui prédominent avec des accumulations de mucus sur la surface dans certains endroits, (B) et une région avec une domination de cellules ciliées sur la surface épithéliale. X2500. source Mescher AL :(accessmedicine.com)

tites voies aériennes (Chang et al., 2008). La surface apicale des cellules ciliées contient également de nombreuses microvillosités (microvilli) (*figure.1.5*), qui jouent un rôle dans le mouvement transépithélial des électrolytes et des fluides (Chang et al., 2008).

### 1.3.3 Composition

Les cils sont des organelles qui s'étendent à partir du corpuscule basal vers la surface apicale de la cellule (Carvalho-Santos et al., 2011). La structure de base est constituée d'un noyau de microtubules de centriole<sup>1</sup> dérivé appelée axonème qui se projette en continu à partir de la membrane plasmatique (*figure.1.7*) (Ishikawa and Marshall, 2011). Les cils sont subdivisés en deux classes, immobiles ou mobiles, sur la base des caractéristiques ultrastructurales physiques de l'axonème (Ishikawa and Marshall, 2011)(Satir and Christensen, 2008). Les cils des voies respiratoires sont dans la classe de cils mobiles, comme les cils trouvés sur

---

1. Le centriole est une structure cellulaire intrahyaloplasmique constituée de neuf triplets inclinés de microtubules, entourés par un certain nombre de protéines collectivement appelé matrice péricentriolaire de MAP

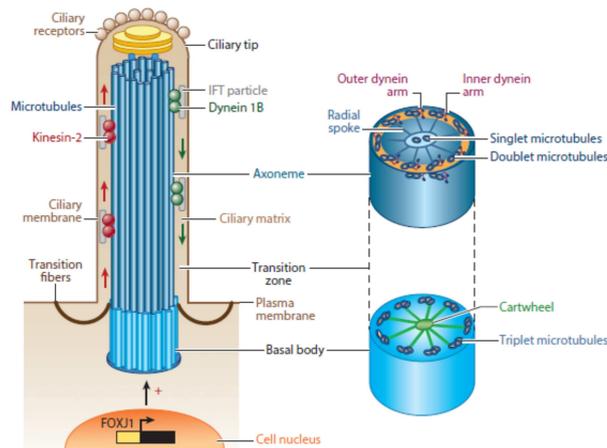


FIGURE 1.7 – Structure des cils des voies respiratoires humaines. Chaque cil des voies aériennes est composé d'un axonème avec neuf doublets de microtubules et une paire centrale de microtubule individuel qui sont entourés par une membrane de cils spécialisé. *source (Tilley et al., 2015)*

les cellules ciliées du cerveau (épendyme), oviductes et conduits de l'épididyme (Choksi et al., 2014)(Kobayashi and Takeda, 2012).

Le cil est un moteur moléculaire composé d'un axonème de type 9+2 avec neuf doublets de microtubules qui entourent une paire centrale de microtubule individuel. Les microtubules de l'axonème sont étirés distalement par les transports intraflagellaires (IFT) de protéines, qui sont synthétisées dans la cellule et déplacées par les moteurs de kinésine-2 du corps basal jusqu'à la pointe des cils, et par les moteurs de dynéine cytoplasmique vers le corps basal. La force nécessaire pour le battement d'un cil est produite par les bras de dynéine externe et interne des doublets de microtubules de l'axonème qui sont connectés à la paire centrale de microtubules par des rayons radiaux (*figure.1.7*).

### 1.3.4 Fonctionnement

Le mouvement ciliaire est fondamental pour l'existence de l'escalator mucociliaire. La taille des cils vibratiles étant supérieure à l'épaisseur de la PCL. L'étirement des cils permet de transmettre l'énergie mécanique à la phase gel (*figure.1.8.A*).

## 1.4 Force motrice et activité ciliaire

---

Le mouvement des cils se décompose principalement en 2 phases (*figure.1.8.B*) :

1 – Phase de propulsion ou la partie effective : Les cils sont en contact avec la couche de mucus uniquement pendant cette phase. Les cils, étirés, se projettent en avant dans la phase gel où la viscosité est élevée ce qui entraîne une augmentation des forces de frottement. Cela s'apparente, d'un point de vue mécanique, à un choc inélastique (la somme des quantités de mouvement n'est pas conservée) avec transmission d'une partie de l'énergie cinétique au gel, énergie qui va servir à le mobiliser. En résumé, les cils transmettent une partie de leur énergie au mucus. La durée de la poussée effective est d'environ 20% du cycle de battement d'un cil.

2 – Phase de récupération : Durant la partie de récupération, une courbure de l'axe des cils oblige leur extrémité à passer sous la couche de mucus, et va donc rester intégralement dans la PCL. Cette phase est très fluide, les forces de frottement sont très faibles et donc le cil ne va pratiquement pas transmettre d'énergie au mucus. Cela évite le retour du mucus et ce dernier est donc propulsé uniquement dans la direction de la partie effective (*figure.1.8.A*) (Sleigh et al., 1988).

Le travail effectué durant la poussée effective est beaucoup plus important que le travail effectué pendant la phase de récupération (Gueron and Levit-Gurevich, 1999). Avant une nouvelle phase de propulsion, les cils observent un temps d'arrêt qui leur permet de recharger leurs réserves en ATP, temps essentiel pour la poursuite du battement.

## 1.4 Force motrice et activité ciliaire

### 1.4.1 Fonction

La fonction principale des cellules ciliées des voies respiratoires est de servir de médiateur de propulsion de la couche de gel viscoélastique (mucus) dans une direction céphalique, maintenant ainsi l'escalator mucociliaire (*figure.1.8.A*) (Knowles and Boucher, 2002)(Button2 et al., 2012). Les cellules ciliées accomplissent ce rôle par le battement hautement coordonné des cils (Knowles and

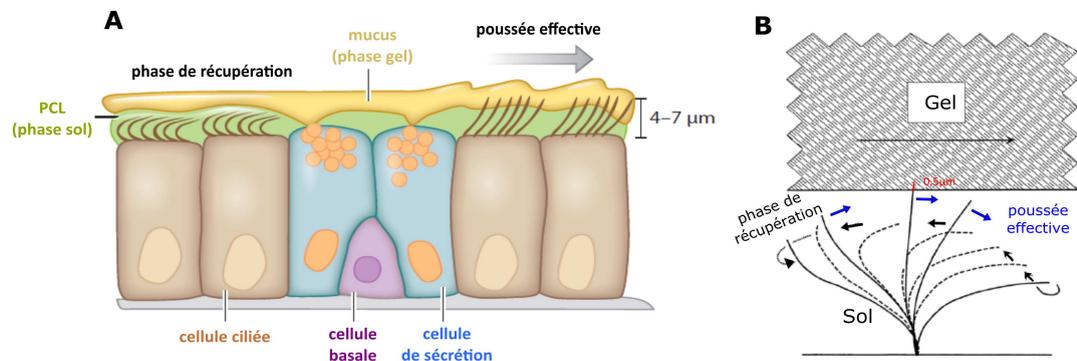


FIGURE 1.8 – (A) Schéma de l'épithélium des voies respiratoires montrant le rôle des cils dans la clairance mucociliaire : L'escalator mucociliaire est composé de la couche gel constituée principalement de mucines produites par les cellules de sécrétion, la couche périciliaire, et les cellules ciliées. Le mucus piège les micro-organismes et d'autres particules inhalées et les transporte hors des voies respiratoires par le battement des cils. Au cours de la poussée effective, les cils s'étendent vers le haut dans la couche de gel propulsant le mucus vers l'avant. Pendant la phase de récupération, les cils reculent et sont contenus complètement dans la couche périciliaire. *source (Tilley et al., 2015)* (B) Série de battement d'un cil montrant le changement de forme à différents intervalles au cours de la poussée effective et la phase de récupération d'un cycle de battement. *source (Knowles and Boucher, 2002)*

Boucher, 2002).

Afin de propulser le mucus, les cils pénètrent dans le mucus d'environ  $0,5 \mu\text{m}$ , le poussent (la partie effective) et reviennent à leur position initiale par un mouvement asymétrique (la partie récupération) (Sanderson and Sleight, 1981) (Knowles and Boucher, 2002) (Wanner et al., 1996). La poussée maximale d'un cil par demi-battements est de l'ordre de  $0,1$  à  $0,4 \mu\text{m}$  (Satir, 1982).

## 1.4.2 Fréquence de battement

La fréquence de battement des cils (CBF pour Cilia Beat Frequency) n'est pas une constante pour un cil donné (Lee et al., 2011). La fréquence de battement de cils chez l'humain dépend de la température. Ugwoke et al. (Ugwoke et al., 2001) ont suggéré que la fréquence de battement des cils est typiquement dans la gamme de  $10$  à  $20 \text{ Hz}$ . Dans une autre étude, Clary-Meinesz et al. (Clary-Meinesz et al., 1992) ont rapporté que la fréquence de battement de cils nasal

## 1.4 Force motrice et activité ciliaire

---

humain était presque nulle en dessous de 5°C et a atteint la fourchette normale de 8-11 Hz entre les 25°C et 45°C. À 50°C, la fréquence de battement de cils nouveau diminue rapidement. Dans le poumon humain sain, les cils battent de 12 à 15 Hz propulsant le mucus dans la direction céphalique de 2 à 20 mm/min (Fahy and Dickey, 2010)(Seo et al., 2014).

Plusieurs molécules de signalisation, y compris l'AMPc, le Ca<sup>2+</sup>, l'oxyde nitrique, ou la progestérone, régulent les fréquences de battement des cils dans les voies aériennes (Jain et al., 2012)(Schmid and Salathe, 2011). En plus, des forces mécaniques comme la contrainte de cisaillement, peuvent réguler la fréquence de battement des cils en modulant les taux de libération apicale de l'ATP et l'afflux ultérieur de Ca<sup>2+</sup> dans les cellules (Button and Boucher, 2008)(Davis and Dickey, 2008).

La fréquence de battement lente est modulée par l'activité de la dynéine ATPase intrinsèque de l'axonème, tandis que la fréquence de battement élevée consiste à augmenter l'activité d'ATPase de la dynéine en réponse à des molécules de signalisation spécifiques (Salathe, 2007)(Schmid and Salathe, 2011)(Braithwaite and Priel, 2008). Par contre les mécanismes de régulation de la synchronisation du battement à travers plusieurs cils sont moins bien compris, et aucun mécanisme de contrôle commun n'a été identifié (Salathe, 2007)(Schmid and Salathe, 2011)(Braithwaite and Priel, 2008). De plus, la plupart des études *in vivo* chez les humains de la fréquence de battement des cils ont été limitées à l'épithélium nasal. Ces études ont démontré que la fréquence de battement des cils est affectée par l'âge, l'exercice et les stimuli environnementaux comme la fumée de cigarette (Agius et al., 1998)(Yaghi et al., 2012). Ainsi, les fréquences de battement des cils ralentissent par exemple avec l'âge (Agius et al., 1998)(Ho et al., 2001)(Svartengren et al., 2005).

### 1.4.3 Force

La force appliquée par un seul cil (sur une surface donnée) lors de la poussée effective a été déduite en utilisant la microscopie à force atomique. Une valeur de force de 0,21 nN, pour des cils de 5 μm de long et de 0,35 μm d'espacement

a été rapportée (Teff et al., 2007). Cette valeur, par rapport à la force appliquée par une molécule de dynéine (5 pN), peut indiquer que la plupart des bras de dynéine le long de l'axonème (§.1.3.3) contribuent à la poussée effective dans les systèmes mucociliaires (*figure.1.7*).

Cette méthode a été appliquée pour évaluer le degré de corrélation entre la fréquence ciliaire, le motif de battement ciliaire et les forces appliquées par les cils (Teff et al., 2008). Il a été constaté expérimentalement que les forces ciliaires appliquée par unité de temps dépendent linéairement de la fréquence de battement des cils (CBF) et a été montré que la longueur de l'arc balayé par les cils pendant la poussée effective reste constante pendant la stimulation de la CBF (Teff et al., 2008).

### 1.4.4 Dynamique

La clairance mucociliaire résulte du degré élevé de coordination entre les cils individuels. Plusieurs hypothèses ont été évoquées : corrélations de phase (ondes métachronales), corrélation de direction, corrélation de sens, interactions hydrodynamiques entre les cils... Cependant, il est à noter deux cas de figures : le "**tapis dense**" (dense mat) avec une densité très élevée de cils et les "**patches**" (claire dense) avec une densité plus faible et des touffes de cils espacées (*figure.1.6*).

#### 1.4.4.1 Cas du tapis dense

Sur une superficie ciliaire active, les cils adjacents maintiennent une différence de phase constante créant dans certains cas particuliers, le "tapis dense", une vague désignée comme "l'onde métachronale" (*figure.1.9*), qui permet à un grand nombre de cils de participer simultanément à l'effort de propulsion de la couche du mucus avec les particules engluées sans interférer les uns avec les autres (cas de l'épithélium du palais<sup>2</sup> de la grenouille, études expérimentales et numériques) (Eshel et al., 1987)(Gheber and Priel, 1990)(Tamm et al., 1975)(Braiman and Priel, 2008)(Jayathilake et al., 2012). La longueur de l'onde métachronale varie entre 20 et 40  $\mu\text{m}$  (Blake, 1973), mais dans la plupart des

---

2. Cavité buccal de la grenouille : la partie supérieure de l'intérieur de la bouche.

## 1.4 Force motrice et activité ciliaire

---

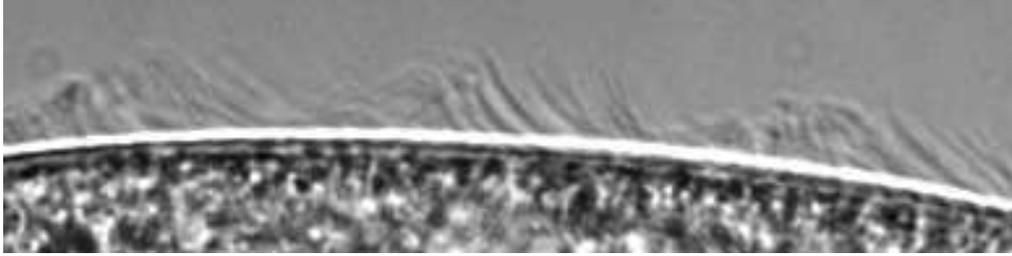


FIGURE 1.9 – Onde métachronale ciliaire observée dans les paramécies. *source : image prise par N.Narematu*

cas, sa direction n'est pas la même que la direction de propulsion (Braiman and Priel, 2008) (simulations numériques).

Les causes de ce comportement coopératif sont mal connues. Une hypothèse faite à partir d'observations sur des paramécies<sup>3</sup> est que le mouvement des cils voisins est couplé par des interactions hydrodynamiques (Okamoto and Nakaoka, 1994). Dans ce cas, le battement d'un cil est influencé par le flux du fluide créé par les autres cils.

On peut se demander si ces interactions hydrodynamiques sont suffisantes pour créer le mouvement coopératif ou si ce dernier est déclenché biochimiquement (Zagoory et al., 2001). Néanmoins, il a été montré que si aucune interaction hydrodynamique n'altère le battement des cils, aucune synchronisation du mouvement ciliaire ne se produit. Cela est le cas particulier des endroits avec une densité de cils faible (Lenz and Ryskin, 2006).

Dans la littérature, plusieurs approches existent pour modéliser ce phénomène (Brennen and Winet, 1977)(Liron, 1976) (Gueron and Liron, 1992) (Gueron et al., 1997) (Gueron and Levit-Gurevich, 1998) (Holwill et al., 1995)(Lagomarsino et al., 2002) (Cosentino Lagomarsino et al., 2003). En particulier, Gueron et al (Gueron and Liron, 1992)(Gueron et al., 1997)(Gueron and Levit-Gurevich, 1998) ont montré pour des modèles de battement spécifiques avec une densité de cils très élevée, que les interactions hydrodynamiques peuvent conduire à la formation des ondes métachronales.

---

3. La paramécie (*Paramecium*) est un genre bien connu de protozoaire cilié unicellulaire de la famille des Parameciidae vivant en eau douce.

Généralement, toutes les approches (expérimentales et simulations numériques) n'ont jusqu'ici considéré que les modèles spécifiques de battement avec une densité élevée de cils conduisant à une synchronisation et une formation d'onde métachronale et pas les cas généraux des interactions hydrodynamiques entre les cils. Pour des densités de cils faibles il est démontré que la stabilité de l'état synchronisé et la relation de dispersion des ondes métachronales ne sont pas universelles (Lenz and Ryskin, 2006). En effet, les études qui prennent les cils existant sous une forme de "tapis dense" et produisant une onde métachronale sont principalement mathématiques (Roy et al., 2013).

L'effet du déphasage entre les cils a été exploré dans les systèmes biologiques (épithélium trachéal du lapin) et il a été montré que les cils ont des différences de phase dans les deux directions "x" (stream-wise) et "y" (span-wise) (Sanderson and Sleigh, 1981). Des simulations numériques ont été faites pour mieux comprendre l'importance de la différence de phase dans les deux directions, et ont montré que s'il y a une différence de phase uniquement selon une seule direction "x", l'onde voyage dans la direction opposée à la poussée effective (Jayathilake et al., 2012) alors qu'elle se déplace dans un angle obtus ( $90^\circ - 180^\circ$ ) à la direction de la poussée effective quand il y a une différence de phase dans les deux directions "x" et "y".

Le mouvement des cils provoque aussi la circulation de la PCL dans les deux directions "x" et "y" comme une fonction de temps et de différence de phase (Jayathilake et al., 2012). Il a également été reporté expérimentalement que la vitesse "stream-wise" (dans la direction "x") de la PCL en absence de la couche du mucus est de  $4.8 \mu\text{m/s}$  (Matsui et al., 1998).

#### 1.4.4.2 Cas du patch

En parallèle, l'étude de la physiologie de nombreux animaux (épithélium de lapin, xénope...) a montré que la synchronisation des cils se produit dans des régions distinctes de l'activité ciliaire, appelées "patches" au lieu de la représentation conventionnelle "tapis dense". Chacun de ces patches est séparé de l'autre et réparti sur l'épithélium cilié des divers organes du corps. Ces patches de cils

## 1.4 Force motrice et activité ciliaire

---

couvrent quelques micromètres carrés (Eshel et al., 1987), et il apparaît que dans les études expérimentales, la coordination des cils ne dépasse pas une distance supérieure à quelques micromètres ( $10\mu\text{m}$ ) (Eshel et al., 1987)(Roy et al., 2013).

Dans certains cas les patchs des cils sont séparés physiquement par des clefts (des fentes) comme dans l'épithélium de la trachée de lapin (Sanderson and Sleigh, 1981), des ridges (des crêtes) ou par des groupes d'autres types cellulaires (*figure.1.6*). Le changement de l'écoulement du mucus dans ces patchs a été observé sous différentes conditions : espacement ciliaire et déphasage (Roy et al., 2013).

Dans une publication par Blake (Blake, 1973) les auteurs décrivent des mécanismes de clairance du mucus dans les poumons de mammifères et indiquent que les cellules ciliées ne représentent pas une forme de tapis dense, comme cela est souvent évoqué, et couvrent approximativement 30-60 % de l'épithélium.

Aussi dans une étude réalisée par Antunes et al. (Antunes et al., 2007) en utilisant la microscopie électronique à balayage (SEM), le degré de ciliation de l'appareil respiratoire murin a été observé. Ils ont trouvé que les cellules ciliées ne se produisent que dans les patchs dispersés. Cependant, le degré de ciliation est hétérogène, tandis que la surface de l'épithélium de la trachée de souris était couverte de 30 à 35% cils, la cloison nasale de souris avait environ 90% de la surface épithéliale ciliée.

Il est à noter que la vitesse de la couche de mucus ne dépend pas seulement du nombre de cils, mais dépend également du degré d'activité coopérative entre les cils et l'espacement entre deux cils voisins le long de la paroi. Quant au transport mucociliaire, il est inefficace si la fréquence de battement des cils ou le nombre de cils est réduit ou si un réseau de cils est immergé dans la couche de mucus pendant la phase de récupération (Lee et al., 2011).

## 1.5 Réponse du mucus : Propriétés physiques du mucus

L'efficacité de l'escalator mucociliaire dépend aussi de la réponse mécanique du mucus (phase gel) aux contraintes de cisaillement générées par les cils. Sur le plan chimique, le mucus est une structure intégrée de biopolymères. Son comportement physique est complexe (non newtonien), avec des propriétés visco-élastiques. La viscosité (résistance à l'écoulement) et l'élasticité (rigidité), sont utilisées ensemble pour décrire la rhéologie du mucus. Ces propriétés rhéologiques varient en fonction de la contrainte et le taux de cisaillement. Une forte résistance à la déformation à des taux de cisaillement faibles et une résistance faible à des taux de cisaillement élevés (Lai et al., 2009). C'est un fluide rhéofluidifiant.

### 1.5.1 Propriétés rhéologiques

Des changements dans les propriétés rhéologiques du mucus peuvent affecter grandement sa capacité à fonctionner comme un lubrifiant, barrière sélective, et ligne de défense initiale contre l'infection en altérant le fonctionnement de l'escalator mucociliaire (Girod et al., 1992)(Slomiany and Slomiany, 1991).

En effet, si le mucus devient trop épais, par exemple dans la bronchite chronique (Dulfano et al., 1971) ou la mucoviscidose (Galabert et al., 1987)(Dawson et al., 2003) où la viscosité des expectorations peut être plus de 100.000 fois celle de l'eau, les patients éprouvent de grandes difficultés à l'élimination du mucus, ce qui modifie les relations avec les microorganismes et le microbiome des voies aériennes.

La caractérisation des propriétés rhéologique du mucus porte essentiellement sur :

- Le module d'élasticité ou de stockage ( $G'$ ), qui mesure la tendance pour le gel à récupérer sa forme d'origine après une déformation induite par le stress.

## 1.5 Réponse du mucus : Propriétés physiques du mucus

---

- Le module visqueux ou de perte ( $G''$ ), qui est la mesure dans laquelle le gel résiste à la tendance de l'écoulement.

Les propriétés viscoélastiques dynamiques de mucus sont étroitement régulées biochimiquement afin d'assurer l'efficacité de l'escalator mucociliaire, tout en conservant une adhérence et une force élastique suffisantes pour être retenu sur la surface épithéliale. La régulation biochimique des différents constituants du mucus est complexe et hautement interdépendante, et l'échec dans une quelconque composante peuvent affecter les propriétés physiques du mucus et contribuer grandement à l'altération du transport mucociliaire.

Le mucus trachéo-bronchique des voies respiratoires de poumon humain sain n'est pas facilement disponible en raison des difficultés de sa collecte. La caractérisation limitée des propriétés physiques du mucus des voies respiratoires peut être effectuée avec du mucus recueilli par une sonde endotrachéale (Rubin et al., 1990) ou par brossage (Jeanneret-Grosjean et al., 1988).

Compte tenu de la difficulté à obtenir le mucus, les résultats de sa viscosité dans les voies respiratoires du poumon sont très variables (*figure.1.10*). Pour des fréquences de cisaillement comprises entre  $10^{-4}$  et  $10^2$  Hz, la viscosité varie beaucoup, couvrant des valeurs aussi élevées que  $10^3$  Pa.s et aussi faibles que  $10^{-2}$  Pa.s. En général, à faible taux de cisaillement, la viscosité du mucus humain est  $10^4$ - $10^6$  fois plus élevée que celle de l'eau ( $10^{-3}$ Pa.s) (Cone, 2009). Toutefois, à des taux de cisaillement près du maximum physiologique  $10^3$ - $10^4$  Hz (réalisés au cours de la toux), la viscosité du mucus est considérablement réduite, et le mucus devient un fluide de faible viscosité (Lai et al., 2009). La pente de la viscosité par rapport au taux de cisaillement de mucus est généralement dans la plage de -1 à -0,5, avec une moyenne de -0,85 (D.B. Yeates, G.J. Besseris, 1997). Dans d'autres études, la viscosité dans l'intervalle de 12 à 15 Pa.s, avec un temps de relaxation d'environ 40 s et un module d'élasticité de 1 Pa, ont été proposé pour représenter un profil rhéologique optimal pour la clairance mucociliaire (Puchelle et al., 1987).

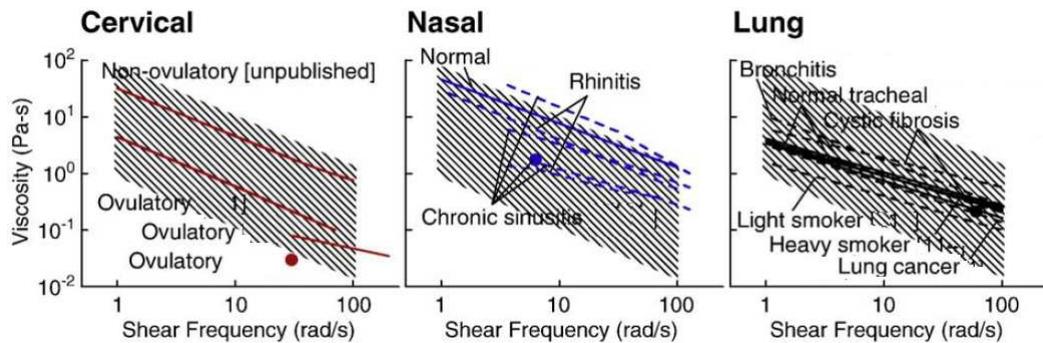


FIGURE 1.10 – La viscosité de divers types de mucus humain. La viscosité dynamique oscillatoire en fonction de la fréquence de cisaillement du mucus cervicale (rouge), nasal (bleu) et des poumons (noir). Les lignes continues correspondent à du mucus normal, tandis que les lignes pointillées correspondent au mucus dans des conditions pathologiques. La région ombrée représente la plage de valeurs pour tous les types de mucus indiqués. *source (Lai et al., 2009)*

### 1.5.2 Concentration

La concentration du mucus joue aussi un rôle important sur le transport mucociliaire. Les comportements visqueux et élastiques sont fortement dépendants de la concentration de mucus (*figure.1.11*).  $G'$  et  $G''$  augmentent avec la concentration du mucus. En outre, si la phase gel du mucus est très concentrée ( $> 7\%$ ), comme dans le cas de la mucoviscidose, le mucus exerce une pression osmotique très grande sur la PCL et écrase les cils (Button et al., 2012) (*figure.1.5.C*). Les cils étant écrasés ne battent pas et donc l'escalator mucociliaire est altéré.

### 1.5.3 Pression osmotique

Dans une même étude sur la mucoviscidose, Button et al. ont montré que la hauteur des cils diminue considérablement avec l'augmentation de la pression osmotique exercée par le mucus. La valeur du module osmotique du mucus normal étant de 300 Pa ( $K_O$ ), Button a montré que 800 Pa représente le module osmotique minimal ( $K_{CC}$ ) nécessaire pour comprimer les cils. Les expériences avec du mucus de l'épithélium bronchique humain ont révélé que le mucus avec un module osmotique  $K = 5700$  Pa, est similaire à celui observé dans la mucoviscidose qui provoque une compression complète des cils. Sur la base de ces données, les cils des voies aériennes ne présentent pas une rigidité suffisante

## 1.6 Modèles d'investigation

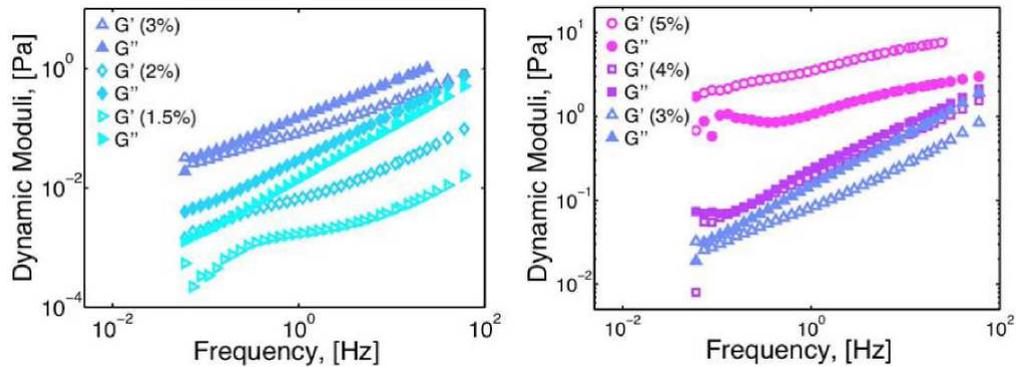


FIGURE 1.11 – Les propriétés viscoélastiques du mucus en fonction de la fréquence de cisaillement. Le module élastique  $G'$  et visqueux  $G''$  en fonction de la fréquence pour du mucus à différentes concentrations de 1,5 à 5,0% en poids de matières solides. *source (Hill et al., 2014)*

pour résister à l'effondrement osmotique au cours de la déshydratation sévère de surface des voies respiratoires (Button et al., 2012).

## 1.6 Modèles d'investigation

La clairance mucociliaire (**MCC**) est un "système d'élimination des déchets" très efficace. Ce système est couplé car le transport dépend de la force résultante appliquée par les cils et de la réponse rhéologique du mucus à cette force. D'une part les propriétés rhéologiques du mucus dépendent des contraintes appliquées (fluide rhéofluidifiant), et d'autre part ces mêmes propriétés peuvent affecter la fréquence de battement des cils.

De nombreuses travaux ont porté sur l'étude des composants individuels de la clairance mucociliaire *in vitro*. Cependant, peu d'études ont été consacrées à explorer la physique du système couplé, en grande partie en raison de la difficulté d'effectuer des mesures quantitatives *in vivo*. La caractérisation *in vivo* de l'activité des cils est impossible. Les cellules ciliées peuvent être collectées à partir de brosse bronchique mais leur suspension dans une solution aqueuse est loin des conditions physiologiques, car il n'y a plus de mucus à leur surface et les cils ne sont plus en contact avec l'air. En outre, la technique la plus courante et la moins invasive pour la mesure de la MCC *in vivo* implique la mesure de la disparition des traceurs radioactifs des voies aériennes (Bennett et al., 2013). Cette

technique a été utilisée pour étudier la MCC chez la souris (Bhashyam et al., 2012)(Foster et al., 2001), le chien (Lay et al., 2003), et le mouton (Sabater et al., 1999), ainsi que chez l'homme (Bennett et al., 2013). Dans des modèles de souris, le transport mucociliaire a souvent été mesuré en suivant le mouvement des particules endogènes ou des marqueurs fluorescents dans la trachée, mais ces procédures sont généralement plus invasives (Grubb et al., 2004)(Look et al., 2001)(Ostrowski et al., 2010)(Zahm et al., 1997). D'autres chercheurs ont utilisé des préparations *ex vivo* pour étudier le transport mucociliaire (par exemple, (Cooper et al., 2013)(Francis and Lo, 2013)(Francis et al., 2009), et bien que ces études aient donné des informations précieuses, l'utilisation de tissu excisé présente des défis supplémentaires.

En raison de l'importance de l'élimination du mucus pour la défense des voies aériennes, un modèle de culture des cellules épithéliales des voies respiratoires humaines à l'interface air-liquide a été développé et semble se rapprocher le plus des conditions physiologiques pour l'étude de la MCC. Les modèles d'étude référencés pour étudier les facteurs susceptibles de modifier le transport du mucus vont être présentés dans les paragraphes suivants.

### 1.6.1 Modèles humains

#### In vitro

Un modèle *in vitro* de cultures épithéliales trachéo-bronchiques humaines bien différenciées a été produit sur des puits de multiplaques (12mm) (Gray et al., 1996) avec différentes étapes de dissociation (Wu et al., 1985) et de culture (Lechner and Laveck, 1985)(Matsui et al., 1998). Ce modèle appelé ALI (Air-Liquid-Interface) représente l'épithélium tel qu'il est dans les voies respiratoires (*figure.1.3.B*) (Gras et al., 2012). Le pourcentage moyen des cils est estimé à 16% (Parker et al., 2012) et la fréquence de battement à 12 Hz (Sears et al., 2015).

En utilisant ce modèle Tarran a montré qu'il y avait une corrélation inverse entre la concentration du mucus (pourcentage du solide) et sa vitesse de rotation (transport du mucus circulaire). La vitesse de rotation du mucus diminue

## 1.6 Modèles d'investigation

---

de  $150 \mu\text{m/s}$  à  $30 \mu\text{m/s}$  lorsqu'on augmente sa concentration de 2,5% à 6,5% (Tarran, 2004). Ces études ont ainsi souligné l'importance de l'hydratation et son influence sur la vitesse du mucus. Il a montré aussi dans une autre étude que l'augmentation de la contrainte de cisaillement libère une quantité d'ATP suffisante pour réguler à la hausse le taux de transport d'ions et augmenter le transport de mucus (Tarran et al., 2005).

Toujours sur le même modèle, Matsui et al. ont incorporé des microsphères dans la couche de mucus de la surface apicale et ont observé un déplacement rotationnel des billes à vitesse angulaire constante, ce qui suggère que le mucus dans lequel elles ont été piégées se déplace comme un réseau (Matsui et al., 1998). La vitesse maximale moyenne des microsphères sur le bord extérieur du réseau rotatif était de  $84,2 \pm 11,2 \mu\text{m/s}$ . En revanche le transport moyen du mucus a été mesuré à  $39,2 \mu\text{m/s}$  (Matsui et al., 1998).

Récemment, il a été montré que le changement de la fréquence de battement des cils affecte directement le transport. La vitesse du transport augmente avec l'augmentation de la fréquence de battement et de manière inversement proportionnelle (Sears et al., 2015).

### Ex vivo

D'autres études faites sur un modèle *ex vivo* "la trachée", indiquent que le transport entraîné par les cils qui battent, dans les voies respiratoires humaines, est possible même en absence de mucus qui a été enlevé et remplacé par des particules de différentes tailles. Si le transport libre du mucus échoue, l'épithélium peut réagir en libérant du mucus ou en augmentant la fréquence de battement ciliaire pour maintenir le transport des particules (Bermbach et al., 2014). Cette même étude montre que lorsque les particules sont attachées aux cils, la fréquence de battement et/ou la production du mucus sont augmentées. Le taux de clairance mucociliaire mesuré de manière non invasive dans les trachées chez l'homme est de  $(66-83 \mu\text{m/s})$  (Salathe, M., O'Riordan, T. G. and Wanner, 1997).

### 1.6.2 Modèles animaux

L'efficacité du transport a été l'objet d'étude sur d'autres modèles animaux avec un épithélium pseudostratifié qui se rapproche de celui des voies respiratoires humaines. Puchelle et al. ont montré, après une analyse de la relation entre les propriétés rhéologiques des expectorations et leurs transport sur la cavité buccale de grenouille, que les taux de transport les plus élevés ont été obtenus avec des échantillons d'expectorations avec une capacité de filage élevée (> 70 mm) et une gamme intermédiaire de viscosité (25-180 P) et d'élasticité (Puchelle et al., 1983).

Cependant, personne ne s'est intéressé, jusqu'à présent, à regarder l'influence du pourcentage des cils sur le transport du mucus dans les différents modèles qui existent.

## 1.7 Anomalies de l'épithélium en pathologie humaine et altération de la clairance mucociliaire

Les anomalies de la clairance mucociliaire et la diminution de la défense immunitaire du poumon, sont un objet commun dans de nombreux troubles pulmonaires acquis ou héréditaires. Dans beaucoup de ces troubles, les cils des voies respiratoires montrent des anomalies structurelles et/ou fonctionnelles.

### 1.7.1 Asthme

#### Définition

L'asthme est une maladie chronique caractérisée par une inflammation des bronches, réagissant de façon excessive (hyper-réactivité bronchique) à certains facteurs (le froid, le tabac, la pollution atmosphérique...). L'asthme associe deux phénomènes : une contraction des muscles qui entourent les bronches et une inflammation qui se traduit par un gonflement de la paroi intérieure des bronches (œdème bronchique) et par une sécrétion plus abondante de mucus (hypersécrétion bronchique). L'ensemble aboutit à une réduction du calibre des bronches

## 1.7 Anomalies de l'épithélium en pathologie humaine et altération de la clairance mucociliaire

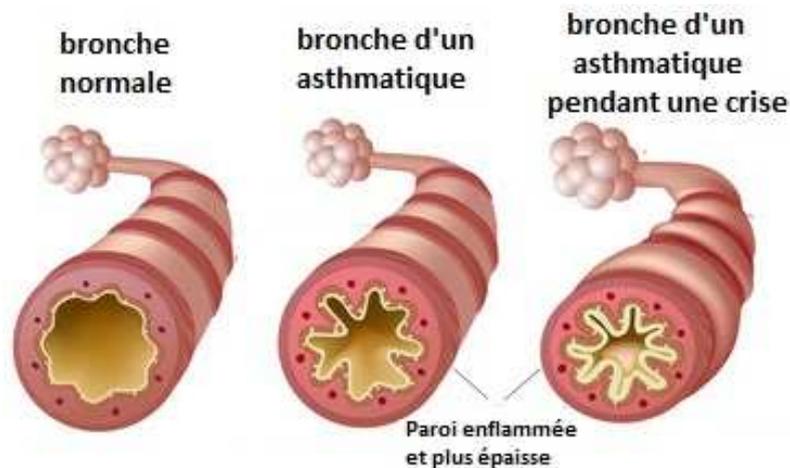


FIGURE 1.12 – Illustration du rétrécissement des bronches chez un asthmatique hors ou pendant une crise. *source : Creapharma*

et donc à la diminution du flux aérien (*figure.1.12*).

### Anomalie fonctionnelle

La clairance mucociliaire est altérée dans l'asthme (Hilding, 1943). Des échantillons d'autopsie suite à une mort par asthme montrent une perte de cils, une détérioration de l'épithélium bronchique, et un échec de la clairance du mucus bronchique avec bouchage des voies aériennes (Hilding, 1943)(DUNNILL, 1960). De plus, beaucoup d'études fonctionnelles chez des sujets asthmatiques ont montré une altération de la clairance mucociliaire (Mezey et al., 1978)(Ahmed et al., 1981), et une clairance anormale des sécrétions est cliniquement apparente chez les patients asthmatiques (Mezey et al., 1978).

Bien que des modifications dans les propriétés de mucus jouent un rôle dans cette altération, les changements de structure et la fonction des cils contribuent également à la diminution de la clairance mucociliaire dans l'asthme. La détérioration de l'épithélium cilié observée au cours de l'autopsie (Hilding, 1943)(DUNNILL, 1960) est également observée dans des cellules obtenues par biopsie et par détachement de l'épithélium des voies aériennes et récupération par lavage broncho-alvéolaire (Beasley et al., 1989).

La microscopie électronique de biopsies épithéliales à la fois chez les enfants et chez les adultes souffrant d'asthme présente des dommages des cellules ciliées, une perte et une structure anormale des cils (Cokuğraş et al., 2001)(Laitinen et al., 1985). De plus, la fréquence de battement de cils immergés dans une solution est réduite dans l'asthme modéré et sévère comparée à la fréquence de battement des cils des contrôles (Thomas et al., 2010), et la direction de battement de cils est désorganisée (Laitinen et al., 1985). Les sujets atteints d'asthme modéré et sévère ont plus de dyskinésie et de cils immobiles que les sujets contrôles, alors que la longueur des cils est inchangée chez les asthmatiques (Thomas et al., 2010).

Liée à ces anomalies de la fonction, la constatation est que les sujets ayant un asthme sévère ont plus de désorientation de cils, une déplétion de cils et des défauts de microtubules comparé à des sujets contrôles et des sujets avec un asthme léger (Thomas et al., 2010).

Quant aux expectorations de patients atteints d'asthme, elles présentent un effet inhibiteur sur les cils qui battent dans des explants épithéliaux bronchiques (Dulfano et al., 1982). Un certain nombre de médiateurs impliqués dans l'asthme augmentent la fréquence de battement des cils (Cyrus et al., 1998)(Joki et al., 1996), et d'autres ont des effets variables sur cette dernière(Cyrus et al., 1998)(Joki et al., 1996)(Schuil et al., 1994).

Une cytokine, dite de type Th2, l'IL-13 est trouvée à des niveaux accrus dans les voies respiratoires des asthmatiques et est un médiateur clé des anomalies épithéliales dans l'asthme (Ingram and Kraft, 2012). Dans les modèles de culture de différenciation mucociliaire, l'IL-13 favoriserait la différenciation des cellules caliciformes et diminuerait le nombre de cellules ciliées (Laoukili et al., 2001).

L'ajout d'IL-13 à l'épithélium différencié des voies aériennes en culture réduit à la fois le nombre de cellules ciliées et le nombre de cils par cellule (Gomperts et al., 2007). Il diminue et éventuellement arrête la fréquence de battement des cils (Laoukili et al., 2001).

## 1.7 Anomalies de l'épithélium en pathologie humaine et altération de la clairance mucociliaire

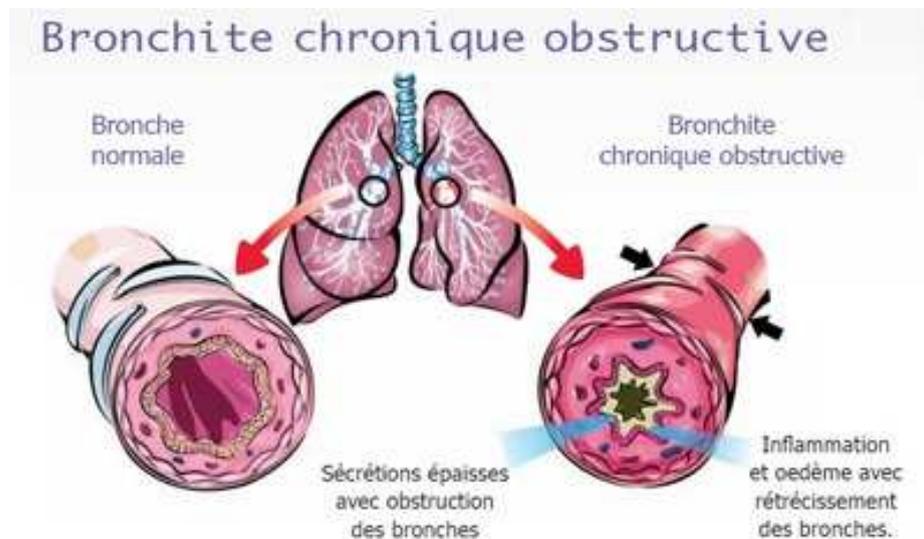


FIGURE 1.13 – Illustration de l'obstruction des bronches dans la BPCO. *source : Guide à l'usage des patients et de leur entourage. 2004. édition Bash*

### 1.7.2 BPCO

#### Définition

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) se définit comme une maladie chronique inflammatoire. Cette affection est caractérisée par une obstruction progressive et permanente des bronches et une diminution non complètement réversible des débits aériens (*figure.1.13*). La BPCO est la cinquième cause de mortalité dans le monde. La principale cause de cette maladie est le tabagisme.

#### Anomalie fonctionnelle

La clairance mucociliaire est aussi altérée dans la BPCO en association avec une vulnérabilité accrue aux infections des voies respiratoires (Camner et al., 1973). Cette diminution de la clairance est attribuée à un raccourcissement des cils provoqué par la fumée de cigarette ainsi qu'une dysfonction épithéliale des voies aériennes (Lam et al., 2013). Les cils des voies respiratoires sont plus courts chez les fumeurs en bonne santé que chez les non fumeurs et même plus courts chez les fumeurs atteints de BPCO que chez les fumeurs sans preuve de la ma-

lady des voies respiratoires (Hessel et al., 2014)(Leopold et al., 2009). Le battement des cils est altéré dans les cils nasaux de personnes atteintes de la BPCO (Yaghi et al., 2012), même après l'arrêt du tabac (Koblizek et al., 2011).

Fumer est reconnu depuis longtemps pour supprimer la clairance mucociliaire chez la plupart des fumeurs et provoquer le ralentissement de cette dernière immédiatement après la fumée d'une cigarette (Albert et al., 1969)(Pavia et al., 1971). Les personnes souffrant de bronchite présentent une réduction de la clairance mucociliaire (Foster et al., 1985) et cesser de fumer améliore les mesures de la clairance mucociliaire nasale par rapport aux valeurs de référence obtenues avant l'arrêt du tabagisme (Ramos et al., 2011).

### 1.7.3 Mucoviscidose (CF)

#### Définition

La mucoviscidose (Cystic Fibrosis "CF") est la maladie génétique grave la plus fréquente. Le mot mucoviscidose vient des mots mucus et viscosité. Évolutive, la CF est une maladie héréditaire due à des mutations dans le gène CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) codant la protéine CFTR membranaire responsable de l'échange d'ions chlorures entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Lorsque son gène est muté, le canal dysfonctionne. Par le biais de différentes cascades biologiques, il en résulte notamment une diminution de l'eau excrétée au niveau des muqueuses et, en conséquence, une inflammation et un épaississement du mucus qui le recouvre. Ce phénomène entraîne l'apparition des symptômes habituels de la mucoviscidose.

#### Anomalie fonctionnelle

La clairance mucociliaire anormale dans la CF conduit à des infections et des bronchectasies répétées (Boucher, 2004). La clairance mucociliaire anormale chez les individus atteints de mucoviscidose résulte des propriétés biophysiques anormales de mucus des voies respiratoires, non principalement de la ciliopathie (Ehre et al., 2014)(Rubin, 2007). Des données animales expérimentales suggèrent que le facteur le plus important dans le contrôle de l'efficacité de la clai-

rance de mucus est l'hydratation de la surface des voies aériennes (Ehre et al., 2014). Dans la CF, la plus grande absorption de  $\text{Na}^+$  et de réduction de la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  conduisent à une réduction de la teneur en eau à la fois dans la couche de mucus et la couche periciliaire (Boucher, 2007). Cette évolution conduit à une couche de mucus qui est hautement adhésive (Boucher, 2007)(Rubin, 2007). En plus de l'état d'hydratation anormale, une hypersécrétion de mucus finit par se produire en réponse à une infection récurrente et l'inflammation persistante et aggrave encore les propriétés physiques et la clairance de mucus (Boucher, 2007).

### 1.8 Méthodes d'évaluation de la structure et de la fonction des cils

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour évaluer la structure et la fonction des cils chez les humains. Des échantillons de cellules ciliées des voies respiratoires peuvent être obtenus par autopsie ou à partir directement du poumon des sujets vivants par brossage bronchoscopique ou biopsie ou en utilisant des échantillons nasaux comme un modèle d'approximation (Lee et al., 1987).

La microscope à lumière transmise peut être utilisée pour évaluer la longueur des cils (Hessel et al., 2014)(Leopold et al., 2009) et la microscopie à contraste de phase afin d'examiner le battement des cils (Veerman et al., 1980).

La microscopie électronique en transmission est utilisée pour évaluer l'ultrastructure caractéristique des cils y compris l'orientation de la paire centrale de microtubules, le nombre et l'emplacement des bras de dynéine, et l'orientation des microtubules périphériques (Veerman et al., 1980).

La tomographie électronique permet en s'appuyant sur les images de microscopie électronique de transmission, de visualiser les structures 3D (Shoemark and Hogg, 2012). La structure 3D de l'épithélium des voies respiratoires peut également être évaluée par microscopie électronique à balayage pour déterminer la présence et le nombre des cils par cellule et pour l'orientation des cils (Veerman et al., 1980).

La fréquence de battement des cils peut être évaluée par vidéo/photographie (Sleigh et al., 1988)(Luk and Dulfano, 1983) ou des méthodes photoélectriques (Low et al., 1984)(Yager et al., 1980) ou par la mesure de la lumière réfléchi par les cils en mouvement par micro photométrie (Cyrus et al., 1998). Les méthodes utilisant la tomographie par cohérence optique permettent la visualisation du mouvement ciliaire et ainsi de mesurer l'activité des cils (Oldenburg et al., 2012). L'analyse du flux optique a également été utilisée pour évaluer le mouvement des cils dans des cellules humaines en culture (Parrilla et al., 2013).

L'évaluation intégrée de la clairance mucociliaire peut être évaluée en plaçant un comprimé ou une solution de saccharine derrière le cornet inférieur et en mesurant le temps jusqu'à ce que le goût sucré soit perçu par le sujet (Braat et al., 1995). Cela peut également être fait en conjonction avec le placement d'une goutte de la solution de carmin d'indigo bleu, permettant la mesure du temps jusqu'à ce qu'une ligne bleue puisse être observé sur la paroi postérieure du pharynx (Braat et al., 1995).

D'autres méthodes consistent à mesurer la clairance de particules marquées dans les voies respiratoires en utilisant la scintigraphie de micro-sphères de technétium marquées à l'albumine ou de macro-agrégats (Weiss et al., 1983)(Zwas et al., 1987) ; sous forme d'aérosol contenant des particules  $\text{Fe}_2\text{SO}_3$  technétium (Foster et al., 1976) ; ou de particules de Téflon marquées avec du technétium, de l'indium, ou de l'or (Mossberg et al., 1978)(Stahlhofen et al., 1981). Le mouvement de particules de Téflon non marquées peut être visualisé en utilisant des la fibroscopie (bronchoscopie) (Wood et al., 1975).

## Chapitre 2

### Matériels et Méthodes

## 2.1 Matériels

### 2.1.1 Matériels biologiques

#### 2.1.1.1 Modèle ALI

Le modèle d'étude est un modèle original *in vitro* de reconstruction 3D de l'épithélium bronchique de patients (asthmatiques légers et sévères et BPCO) et de sujets sains tel qu'il est observé dans les voies aériennes humaines et qui garde en mémoire le phénotype de la maladie (Gras et al., 2012). Ce modèle est développé sur des inserts de type transwell (12 mm de diamètre, 0,4 mm de taille de pore) placés dans les plaques de culture multipuits (plaques de 12). Le milieu de culture utilisé est spécifique et constitué d'un mélange 1 :1 de milieu de croissance épithélial bronchique (BEGM, Lonza, Bâle, Suisse) et de Dulbecco milieu de Eagle modifié (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, Californie) enrichi en acide rétinolique et BSA. Les cellules baignent dans ce milieu au niveau basolatéral mais sont à l'air au niveau apical afin d'établir l'interface air-liquide (ALI) (*figure.2.1*). Les cellules sont maintenues en culture pendant 4 semaines afin d'obtenir une population de cellules ayant un phénotype différencié mucociliaire. Elles sont utilisées à la cinquième semaine, lors de l'apparition des touffes de cils qui battent. La durée de vie des cultures peut cependant aller jusqu'à plusieurs semaines (8 semaines en moyenne).

Le deuxième modèle utilisé est un modèle commercial qui reproduit également *in vitro* de l'épithélium des voies aériennes humaines. Contrairement à notre modèle, les cellules sont obtenues post-mortem, et après expansion, cultivées sur des transpuits de 6 mm de diamètre (Epithelix, MucilAir, Suisse). Le milieu de culture prêt-à-utilisation est sans sérum et contient des facteurs de croissance (Epithelix, milieu de culture MucilAir, Suisse).

#### 2.1.1.2 Marquage fluorescent

Un triple marquage a été réalisé sur les cellules épithéliales. Les noyaux ont été marqués par le bisBenzimide H 33342 (Sigma- Aldrich) qui excite à 405 nm dans le violet et qui émet dans le bleu-violet 465nm. La tubuline a été marqué

## 2.1 Matériels

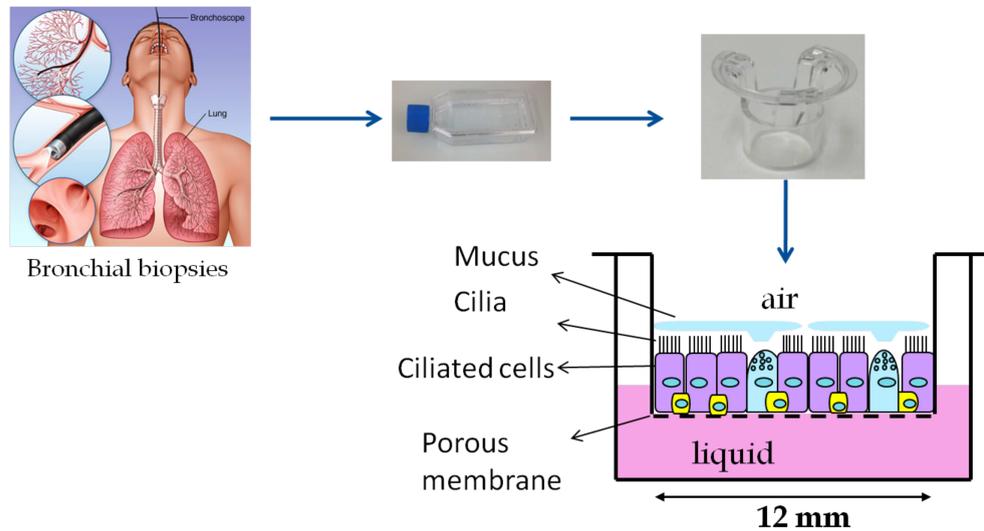


FIGURE 2.1 – Les étapes de la culture cellulaire du modèle épithélial ALI.

par le TubulinTracker (Invitrogen) et les mitochondries par le MitoTracker (Invitrogen) qui excitent/émettent à 494 nm (bleu) / 522 nm (vert) et 581 nm (jaune-orangé) / 644 nm (rouge) respectivement.

### 2.1.2 Instruments

#### 2.1.2.1 Microscopie à transmission

La microscopie optique à transmission a été réalisée sur un microscope inversé Nikon Eclipse Ti équipé d'un Z motorisé (mouvement haut/bas) et de 4 objectifs x10, x20, x60 (à l'air) et x100 (à l'huile) contrôlé par le logiciel Nikon Control. Les observations ont été faites à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub> (dans une boîte faite maison) en utilisant des ventilateurs de chauffage (FLH 400, Pfannenberg) contrôlés par un indicateur digital (Di eco, Jumo) et une pompe à air (OkoLab, Italie) équipée d'une bouteille de CO<sub>2</sub>. La caméra utilisée pour l'acquisition est une Photron SA4 contrôlée par le logiciel PFV (Photron FASTCAM Viewer).

#### 2.1.2.2 Microscopie à fluorescence

Le même microscope à transmission est équipé de 3 cubes de fluorescence constitués chacun de deux filtres (filtre d'excitation et filtre d'arrêt) et d'un miroir dichroïque. Les 3 cubes permettent d'exciter/émettre dans le violet/bleu,

bleu/vert et vert/rouge. Le contrôle de l'intensité de fluorescence ou des cubes peut être effectué manuellement ou par le logiciel Nikon Control. Pour l'acquisition en fluorescence, nous avons utilisé une caméra sensible (Andor, sCMOS Neo) contrôlée par deux logiciels en fonction de l'expérience : Andor sCMOS ou Micro-Manager.

### 2.1.2.3 Microscopie confocale

La microscopie confocale a été réalisée au plateau de ressources en imagerie de l'IBDM. Deux microscopes confocaux ont été utilisés. Le premier en dynamique, utilisant un disque rotatif Roper fonctionnant sur un Nikon inversé Eclipse Ti (objectifs : x60, x40 et x20) équipé de deux caméras EMCCD Photometrics évoluées le tout contrôlés par le logiciel MetaMorph. Le second est un microscope confocal classique, permettant d'avoir des images en haute résolution fonctionnant sur un Zeiss 510 inversé contrôlé avec le logiciel LSM510.

## 2.2 Méthodes

Toute manipulation de cellules (changement de milieu, lavage, marquage...) est faite sous une hotte à flux d'air laminaire ascendant, vertical et agrémenté d'un filtre à particules. L'air soufflé est stérile, et tout ce qui est sous la hotte est en zone propre pour éviter toute contamination par dépôt. Toutes les observations ont été faites à 37°C et en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.0.4 Culture ALI

Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37 °C sous 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à leur utilisation avec un renouvellement du milieu tous les 2 jours. Un lavage est effectué dès la réception des cellules puis en fonction du type d'expérience et de la production du mucus qui varie d'une culture à une autre. Le lavage des cellules se fait au niveau apical avec 500 µl de PBS (Phosphate Buffered Saline) et cela après avoir prélevé le mucus sécrété à l'aide d'une pipette. Pour certaines expériences, une incubation avec 500 µl de DTT (dithiothréitol) à 10 mM suivi de 10 lavages avec du PBS ont été réalisés afin de casser les ponts di-sulfures du mucus et l'enlever complètement (Matsui et al., 1998).

## 2.2 Méthodes

---

Tableau 2.1 – Modulation pharmacologique.

Drogues	DMSO	GSK	2-APB	ATP	EGTA
Concentration	1/1000	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	100 $\mu$ M	5 mM
incubation	30 min	30 min	30 s	30 min	5 min

### 2.2.0.5 Concentration de mucus

Le mucus est obtenu en le laissant s'accumuler sur la surface de l'épithélium durant plusieurs jours (jusqu'à 1 semaine), puis aspiré par pipetage et mis en commun en additionnant 24 puits d'un même sujet. La mesure du rapport sec à l'état humide sur le mucus de chaque patient a été effectuée sous vide à 65 °C pendant une nuit (Tarran, 2004). La concentration obtenue a été définie comme le rapport de la masse totale de solides secs mesurés sur le mucus après séchage sur la masse initiale de mucus.

### 2.2.0.6 Triple marquage fluorescent

La structure de l'épithélium a été imagée par une technique de triple marquage des cellules épithéliales (§.2.1.1.2). Tout d'abord, le mucus a été retiré de la partie supérieure de chaque puits étudié, qui a été ensuite lavé avec du PBS (500  $\mu$ l). Le PBS a été finalement retiré de la partie supérieure du puits. Les trois marqueurs, bisBenzimide H 33342, TubulinTracker et MitoTracker ont été mélangés et dilués dans du PBS aux concentrations finales de 10nM, 500 nM et 250nM respectivement. Après incubation des marqueurs sur le pôle apical des cellules pendant 30 minutes à 37 °C / 5 % de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS (500  $\mu$ l) avant l'imagerie.

### 2.2.0.7 Modulation pharmacologique

Une première mesure de battements ciliaire a été faite après avoir enlevé le mucus et un lavage au PBS (500 $\mu$ l). Ensuite, chaque modulateur pharmacologique a été ajouté selon les concentrations et temps d'incubation indiqués dans le tableau.2.1. Les mesures ont ensuite été effectuées.

### 2.2.1 Observation microscopique

Structure de l'épithélium. Les images de haute résolution en microscopie confocale XZ de l'épithélium ont été obtenues en utilisant les deux confocaux i.e classique et dynamique (§.2.1.2.3) en imageant avec différents grossissements (objectifs : x60 à eau, x40 à huile et x20 à air). Les cultures de cellules marquées en fluorescence (§.2.2.0.6) ont été placées dans des boîtes de culture avec un fond de verre (MatTek, États-Unis) auxquelles on a collé le contour d'une boîte de pétri permettant de travailler avec des objectifs à immersion. Des piles de 45-50 images ont été enregistrées tout les 0,6 ou 0,8  $\mu\text{m}$  en z en partant du haut de la culture d'épithélium.

Les cils mobiles. Les touffes de cils mobiles ont été détectées directement avec l'imagerie confocale rapide (Disque rotatif Rooper) (§.2.1.2.3). La mesure de la fraction de touffes mobiles a été faite avec plus de précision en comparant les images obtenues par microscopie à fluorescence en se mettant au niveau des cils en z (ce rendement étant le nombre total des touffes de cils) avec celles obtenues en lumière transmise sur le même plan (Z) et même positionnement (XY). La durée du film, qui est la même en fluorescence et en transmission, est de 5 secondes avec un frame rate de 20 images par seconde.

Dynamique de l'épithélium. Le déplacement des cellules épithéliales à l'intérieur de l'épithélium a été observé en transmission avec l'objectif x60 à air pendant une heure avec une fréquence d'acquisition de 12 images par minute, en établissant une seule acquisition par patient au milieu du puits de culture. L'épaisseur de l'épithélium a également été mesurée à l'aide du Z motorisé du microscope en transmission (§.2.1.2.1) en moyennant cinq mesures, d'un seul puits, sur la même ligne horizontale du puits de culture en partant de la droite vers la gauche en passant par le milieu.

Densité et fréquence de battement. La densité et la fréquence de battement des touffes de cils mobiles ont été observées avec le grossissement x60 à air et une fréquence d'acquisition de 250 images par seconde pendant 3 secondes en transmission avec la caméra rapide Photron SA4 (§.2.1.2.1). Pour chaque sujet (contrôle, asthme léger / sévère et BPCO), trois puits ont été analysés. Pour

## 2.2 Méthodes

---

chaque puits, trois observations ont été effectuées dans une zone de  $255 \times 255 \mu\text{m}^2$  (une au centre du puits et deux sur les côtés opposés). Toutes les expériences ont été réalisées en présence de mucus (avant lavage), puis après aspiration du mucus et lavage avec du PBS ( $500 \mu\text{l}$ ).

Transport du mucus et des billes. Le transport du mucus et des billes a été étudié avec les objectifs x10, x20 et x60 à air en suivant le mouvement des hétérogénéités de mucus ou des billes microscopiques ( $1 \mu\text{m}$ , fluorescentes rouge). Ces billes ont été incorporées *in situ* sur la partie apicale des cultures après avoir enlevé le mucus et lavé avec du PBS, en utilisant la caméra Photron SA4 en transmission (§.2.1.2.1) et la caméra Andor Neo sCMOS en fluorescence (§.2.1.2.2). Le temps d'acquisition a été adapté en fonction de la vitesse de déplacement des billes/mucus et en fonction du grossissement utilisé. Le transport a été évalué en présence du mucus et après avoir enlevé la couche du mucus suivi d'un lavage au DTT comme décrit précédemment.

Fréquence en immersion. Les cellules ciliées de la culture ALI ont été séparées les unes des autres par grattage à l'aide d'un cône de pipette (P1000) et placées dans le milieu de culture approprié (§.2.1.1.1) dans des boîtes de culture avec un fond de verre (MatTek, États-Unis) permettant l'observation avec l'objectif x100 / 1,45 à huile en microscopie de transmission en utilisant une caméra rapide (§.2.1.2.1). L'acquisition des images et la détermination des fréquences ont été déterminées comme précédemment (§.2.2.1).

### 2.2.2 Méthode d'analyse

#### 2.2.2.1 Analyse d'image

Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant un logiciel Fiji (open source).

**Densité et fréquence de battement** L'analyse des données de densité et de fréquence de battement des cils a été effectuée en soustrayant l'intensité moyenne des pixels à l'ensemble du film (la pile d'images). Ce processus a été utilisé pour mettre en évidence les cils mobiles de la pile (*figure.2.2*). Dans chaque domaine d'observation, le pourcentage des touffes de cils mobiles a été mesuré

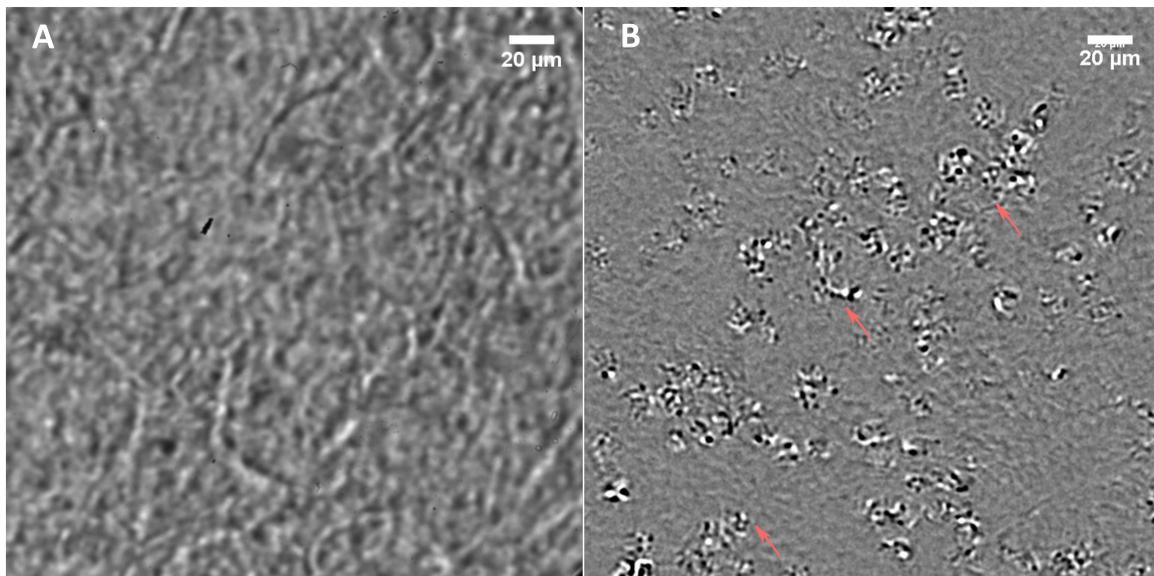


FIGURE 2.2 – Image représentative de l'échantillonnage des cils (A) avant traitement et (B) après traitement avec Fiji. Les cils sont représentés par les flèches rouges (↑).

et la fréquence de battement moyenne a été déterminé sur cinq touffes de cils choisies au hasard en moyennant 20 cycles de battement pour chaque touffe choisie et en normalisant par rapport à la fréquence d'acquisition.

**transport du mucus et des billes** le transport du mucus et des billes a été obtenu en en superposant une pile d'images d'un film qui permet de déterminer les trajectoires des chemins parcourus par les billes/mucus. Ensuite en fonction de la trajectoire (circulaire ou linéaire) la période de rotation, la vitesse angulaire et/ou la vitesse linéaire sont déterminées. Dans le cas circulaire, la période est définie sur une rotation entière ou en mesurant le temps et l'angle d'un arc de cercle et en projetant ce dernier à  $360^\circ$ . Et dans le cas linéaire, la vitesse est mesurée par la distance parcourue entre le début et la fin de la trajectoire en fonction du temps.

**Dynamique de l'épithélium** Pour la dynamique de l'épithélium, le déplacement des cellules est déterminé par une simple mesure de la distance d'une même jonction de cellules au début de l'acquisition du film et une heure après.

## 2.2 Méthodes

---

### 2.2.2.2 Analyse statistique

L'analyse statistique a été faite par Nicolas Molinari, bio-statisticien à l'Université Montpellier I. Un modèle à effet aléatoire a été employé. Afin de prendre en compte le fait que les observations sont multiples pour un même échantillon et pour tenir compte de l'effet la culture dans les analyses, un modèle à effets mixtes a été ajusté. Le sujet et la chambre de culture ont été considérés comme des effets aléatoires. La localisation (l'endroit de l'analyse), le groupe (sujets sains ou malade) et le temps (avant et après lavage) sont les effets fixes du modèle.



# Chapitre 3

## Résultats

Notre objectif est de mieux comprendre la mécanique de la clairance mucociliaire et de cerner les causes mécaniques de l'altération de cette clairance dans l'asthme sévère (et la BPCO). Nous avons vu que les acteurs principaux étaient i) les cellules épithéliales ciliées dont l'activité ciliaire fournit la force de propulsion de la couche de surface principalement composée de mucus (nous l'appellerons couche de mucus ou plus simplement mucus), ii) Les propriétés viscoélastiques et osmotiques de la couche de mucus qui déterminent la réponse du mucus à la force de propulsion et, notamment, sa vitesse, iii) la couche périciliaire dont le fluide est aussi mis en mouvement par les cils. Nous avons vu que le système était complexe par le couplage des effets. Enfin nous avons vu que l'on pouvait disposer de modèles d'épithéliums reconstitués pour explorer ces questions in-vitro. Nous avons travaillé sur ces modèles issus de contrôles et de patients atteints d'asthme léger, d'asthme sévère et de BPCO.

Nos résultats sont présentés de la manière suivante. D'abord, nous présentons très brièvement la structure de ces épithéliums modèles. Ensuite nous explorons l'activité ciliaire de ces modèles en terme de taux d'activité, de densité de touffes ciliaires et de fréquence de battement.

Nous présentons ensuite nos résultats sur la clairance mucociliaire en étudiant le transport de mucus et d'un fluide newtonien à la surface des épithéliums. Nous établissons comment l'activité ciliaire détermine ce transport et mettons en évidence la remarquable coordination de l'activité ciliaire. Nous discutons ensuite la nécessaire communication entre cellules ciliées et le rôle joué par le mucus.

Enfin nous appliquons les résultats obtenus au cas des pathologies et nous proposons une cause mécanique pour comprendre la mauvaise clairance mucociliaire. Nous discuterons du rôle du mucus à ce moment là. Nous finirons ce chapitre par une discussion conclusive.

### 3.1 L'épithélium reconstitué : Notre modèle d'étude

#### 3.1.1 structure de l'épithélium

Nous avons observé la structure de l'épithélium en ALI par microscopie confocale en effectuant un triple marquage fluorescent sur des cultures vivantes (§. 2.2.0.6). La reconstruction 3D des images obtenues en microscopie confocale, (*figure.3.1*), montre un épithélium pseudo-stratifié, complètement différencié similaire à celui des voies aériennes observé sur les biopsies endobronchiques (Gras et al., 2012)(Crystal et al., 2008). Toutes les cellules partent de la base, avec des noyaux situés à différentes hauteurs (*figure.3.2*).

La partie inférieure est composée de cellules basales visibles par des noyaux entourés par la tubuline et marquée par la TubulinTracker (vert). Ces cellules ne s'étendent pas jusqu'à la surface de l'épithélium (*figure.3.2.A1,B1*). A la surface de l'épithélium on voit essentiellement de cellules caliciformes et de cellules ciliées qui apparaissent en rouge (mitochondries marquées par MitoTraqueur) et semblent former des jonctions serrées (*figure.3.2.A2*). Le pourcentage des cellules ciliées mesuré sur 6 sujets sains est de 9%.

En zone apicale, on trouve les cils marqués par la TubulinTracker (vert) qui sont situés au dessus de la membrane des cellules ciliées. Ils ont une hauteur moyenne de  $6,8\mu\text{m}$  (*figure.3.2.C,D*) identique à celle mesurée dans les voies aériennes supérieures (Chang et al., 2008).

Le pourcentage de cellules ciliées est faible, 5 fois moins important que celui rapporté dans les voies respiratoires humaines (Raman et al., 2009). Mais il a été mesuré sur un petit échantillonnage et sur un champ optique limité. Une mesure plus précise sera donnée à partir des observations de microscopie optique à faible grossissement et effectuées sur un grand échantillon.

#### 3.1.2 dynamique et épaisseur

Nous avons mesuré systématiquement l'épaisseur de l'épithélium ALI en microscopie à transmission (16 sujets sains) et en microscopie confocale (6 sujets

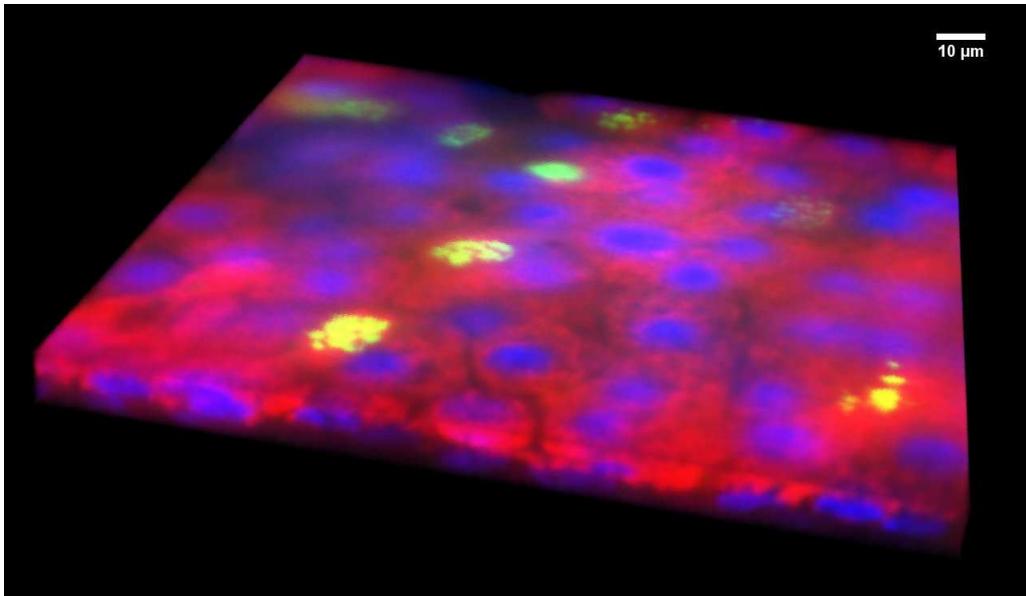


FIGURE 3.1 – Reconstruction 3D de l'épithélium sain obtenu en culture ALI par microscopie confocale. Les cellules calciformes et les cellules ciliées apparaissent en rouge (marquage au MitoTracker), leurs noyaux en bleu (marquage au bisBenzimide H33342) et les cils avec en vert-jaune (marquage au TubulinTracker).

sains). La valeur moyenne de l'épaisseur est de  $23 \mu\text{m}$ , qui est une épaisseur normale pour un épithélium. Nous nous sommes intéressés aussi à la dynamique des cellules épithéliales jointives (connectées) et nous avons mesuré leur déplacement moyen en microscopie à transmission. Ce mouvement d'ensemble des cellules sur 13 sujets sains est de l'ordre de  $22 \mu\text{m}/\text{heure}$  (*tableau.3.1*). Les épithéliums sont donc stables.

### 3.1.3 Incidence sur les maladies

Nous observons que la structure des épithéliums reconstitués est moins homogène dans les épithéliums des sujets asthmatiques et nous avons relevé certaines différences. De manière qualitative, l'épithélium est moins compact et moins bien organisé (*figure.3.2.B*). De plus, nous avons estimé la densité surfacique des différentes cellules en comptant les noyaux et nous avons trouvé qu'elle est aussi affectée. Elle est de  $0,75/\mu\text{m}^2$  chez les témoins et diminue jusqu'à  $0,44/\mu\text{m}^2$  chez les sujets atteints d'asthme sévère (*le tableau.3.1*). Quant au pourcentage des cellules ciliées (*figure.3.2.A3,B3*), il diminue jusqu'à 4% dans l'asthme léger (2 sujets) et l'asthme sévère (4 sujets). Cependant, la longueur

### 3.1 L'épithélium reconstitué : Notre modèle d'étude

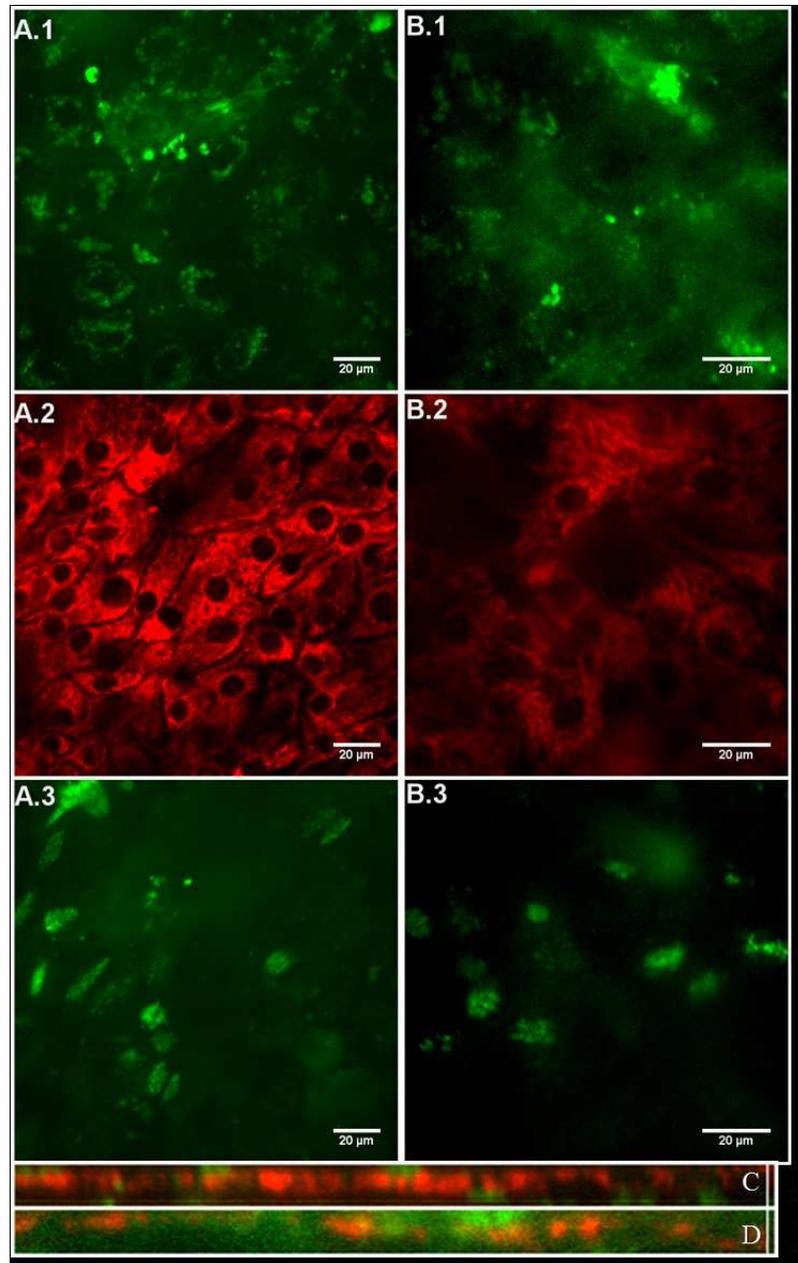


FIGURE 3.2 – Structure pseudo-stratifiée de l'épithélium reconstitué vivant en microscopie confocale : (A) groupe contrôle (B) asthme sévère ; 1) les cellules basales sont détectées par les microtubules marqués avec le TubulinTracker ; 2) les cellules calciformes et ciliées apparaissent en rouge (marquage au MitoTracker) avec une répartition homogène dans le groupe contrôle (A.2) et non homogène dans l'asthme sévère (B.2) ; 3) les touffes de cils marquées avec le TubulinTracker ; des images représentatives XZ en microscopie confocale des cultures ALI pour (C) le groupe contrôle et (D) l'asthme sévère

Tableau 3.1 – Les caractéristiques de l'épithélium ALI déterminées par microscopie optique et confocale.

Groupes		Témoin	AL	AS	BPCO
Épaisseur( $\mu\text{m}$ )		23.2±2.4(16)	23.5±3(15)	22.4±1(4)	21.6±2.5(3)
Dynamique( $\mu\text{m}/\text{h}$ )		21.9(13)	16(11)	18.4(4)	18.2(3)
densité des cellules	1 <sup>ere</sup> couche( $/\mu\text{m}^2$ )	0.13(6)		0.1(4)	
	2 <sup>eme</sup> couche ( $/\mu\text{m}^2$ )	0.62		0.34	

moyenne des cils restent la même pour les différents groupes dans notre modèle (*figure.3.2.C,D*).

En revanche l'épaisseur et la dynamique de l'épithélium ne sont pas affectées de manière significative par la pathologie (asthme léger (4 sujets), asthme sévère (15 sujets) et BPCO (3 sujets)) (*tableau.3.1*).

En conclusion, les épithéliums reconstitués sont stables et ont une structure pseudo-stratifiée satisfaisante.

## 3.2 Activité ciliaire

L'activité ciliaire va être caractérisée par deux paramètres principaux : la densité de touffes ciliaires actives qui recouvre la surface épithéliale, exprimée en pourcentage de surface de l'épithélium recouvert par les touffes ciliaires dont les cils battent, et la fréquence des battements de cils.

### 3.2.1 Densité de surface des touffes de cils actives

Nous avons échantillonné, analysé et mesuré le pourcentage de la surface de l'épithélium occupée par les touffes ciliaires actives (cils qui battent) " $\varphi$ " sur les chambres de culture à partir de mesures par microscopie à transmission (§.2.2.1). Sur 17 cultures de témoins le pourcentage moyen est de  $\simeq 16\%$ . Il est en accord avec ceux rapportés dans la littérature sur un épithélium reconstitué ALI (Parker et al., 2012)(Adam et al., 2015).

## 3.2 Activité ciliaire

---

Cependant, ce pourcentage de couverture  $\varphi$  reste plus faible que celui, global, estimé pour certains organes du système respiratoire comme la trachée (49%) (Raman et al., 2009). Cet écart est peut être dû à une absence de cils ou à des touffes dont les cils sont immobiles qui ne sont pas détectées par nos mesures. Nous avons donc mené des expériences de fluorescence, en effectuant un triple marquage sur des épithéliums vivants (§.2.2.0.6), en combinant la microscopie optique à transmission et la microscopie à fluorescence afin d'observer et de quantifier toutes les touffes de cils présentes sur la surface de l'épithélium et de pouvoir distinguer les touffes actives et les touffes non-actives.

Comme illustré dans la figure.3.3.B,C, l'image en transmission ne nous permet d'observer que les touffes de cils actives présentes dans le champ de la caméra alors que l'image en fluorescence nous permet d'avoir l'ensemble des touffes (actives et inactives) dans le même champ de vision. Nous pouvons donc discriminer celles qui sont inactives (les touffes de cils marquées avec des étoiles rouges ★ dans la figure.3.3.C).

Nous avons trouvé un taux de touffes de cils inactives de 19,5% (sur 6 sujets sains). Si nous tenons compte de ce taux dans le résultat précédent qui estimait la couverture de touffes ciliées actives ( $\varphi$ ), nous pouvons estimer la couverture totale de l'épithélium par les touffes ciliaire de l'ordre de  $\simeq 20\%$ .

### 3.2.2 Fréquences de battement des cils (CBF)

Le deuxième paramètre mesuré est la fréquence de battement des cils (CBF). La CBF est mesurée pour une touffe de cils en moyennant sur 20 cycles de battement (*figure.3.4*). Pour chaque sujet nous avons moyenné 45 valeurs de CBF sur un ensemble de trois chambres de culture à l'interface air-liquide à partir d'observations effectuées sur le plan apical des cils (*figure.3.5*)(§.2.2.0.4). La CBF médiane en présence du mucus sur la surface épithéliale est de 18,2 Hz pour le groupe témoin (17 sujets).

Il est intéressant de comparer nos résultats à ceux rapportés dans la littérature pour les épithéliums reconstitués et pour des épithéliums réels ex-vivo.

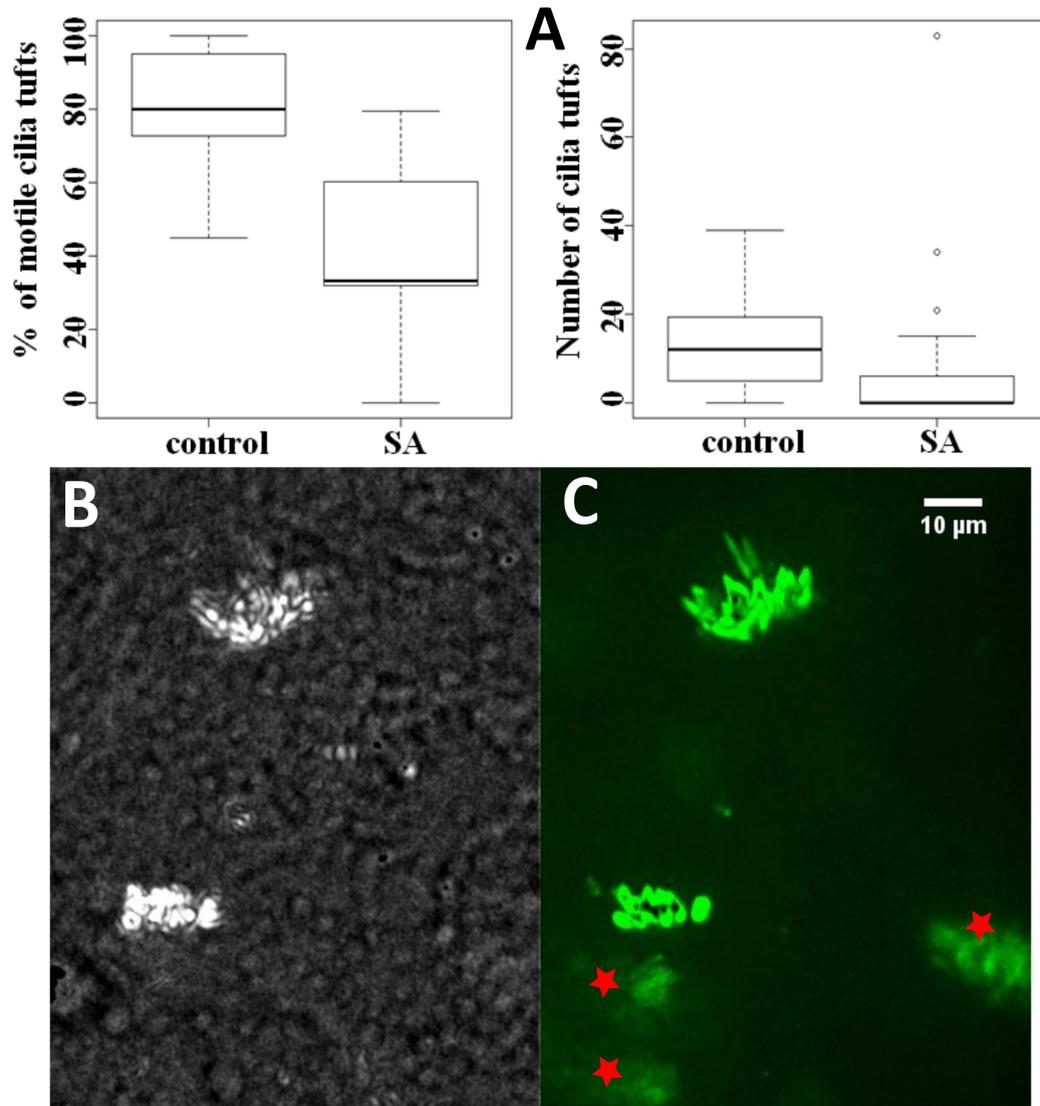


FIGURE 3.3 – Touffes de cils actives et inactives dans les cultures ALI de sujet témoin ou atteint d’asthme sévère à l’interface air-liquide. **(A)** Le pourcentage des touffes de cils actives (à gauche) et le nombre total des touffes de cils sur une surface de  $165.165\mu m^2$  chez les témoins et les asthmatiques sévères (à droite). Les résultats sont exprimés sous forme de médianes et inter-quartiles avec 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles. \* $P < 0,01$ , modèle à effet aléatoire. Images représentatives montrant les touffes de cils prises par microscopie **(B)** à transmission et **(C)** à fluorescence. Les touffes de cils sont marquées avec le TubulinTracker et les étoiles rouges \* correspondent aux touffes de cils inactives.

### 3.2 Activité ciliaire

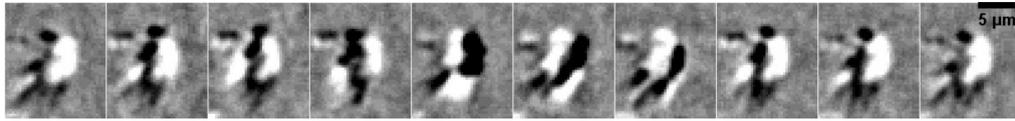


FIGURE 3.4 – Cycle de battement d’une touffe de cils avec un intervalle de 6 ms entre chaque image.

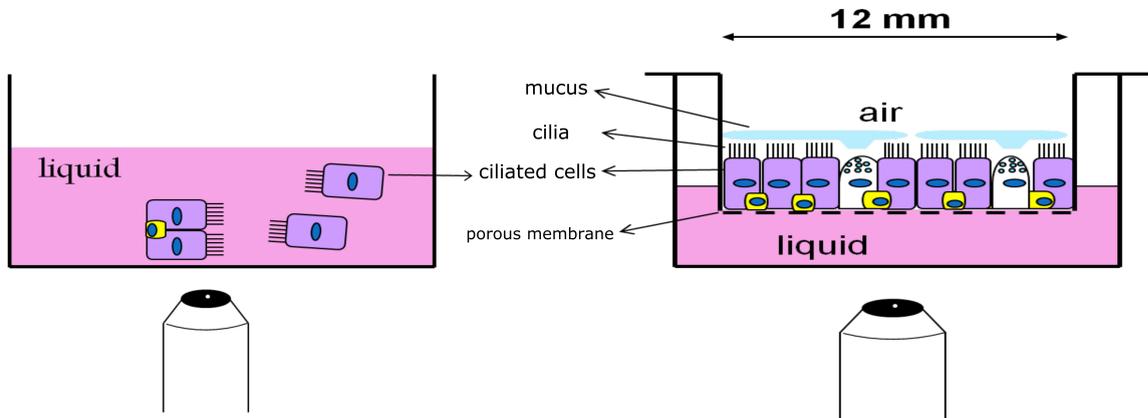


FIGURE 3.5 – Observation des battements de cils en immersion à gauche et sur le modèle ALI à droite.

La CBF que nous avons mis en évidence est plus grande que celle rapportée récemment dans la littérature pour le même modèle de culture (12Hz (Sears et al., 2015)). Il y a peu d’études des fréquences des battements des cils sur ce modèle de culture et réalisées à partir de biopsies endo-bronchique. La plupart sont obtenues par brossage du nez (16 Hz(Hirst et al., 2014)).

Dans d’autres études, les fréquences de battement des cils ont été mesurées lorsque les cellules ciliées sont immergées dans un tampon. Des cellules obtenues par brossage ont été immergées dans une solution et une fréquence comprise entre 10-15 Hz a été rapportée (Thomas et al., 2010) (Yager et al., 1978). Dans le même contexte et en parallèle avec nos précédentes expériences, nous avons effectué des mesures de la fréquence des battements des cils sur des cellules issues de nos cultures, séparées les unes des autres et placées en solution (§.2.2.1) avec une observation le long de la direction perpendiculaire au plan de mouvement des cils (figure.3.5).

Nous avons relevé une fréquence médiane de battement des cils significativement plus faible lorsque les cellules ciliées sont immergées dans une solution. Cette dernière diminue de 18,21 Hz en ALI à 15,37 Hz en immersion (\*  $P < 0,0001$ ), en accord avec la limite supérieure rapportée par (Thomas et al., 2010).

En conclusion, nous avons montré que les épithéliums reconstitués présentent une activité ciliaire et nous disposons de deux paramètres, le taux de couverture de l'épithélium par les touffes ciliaires actives ( $\varphi$ ) et la fréquence de battement des cils (CBF). L'effet des maladies chroniques des voies aériennes sur ces paramètres sera discuté en fin de chapitre.

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

Dans ce paragraphe nous abordons le cœur de la question physique du transport de fluide sur l'épithélium, du rôle de l'activité ciliaire qui fournit la force de propulsion, de la coordination des forces locales exercées par les touffes ciliaires et du couplage cils-mucus.

#### 3.3.1 Transport du mucus et des billes

Nous avons exploré d'une part le transport de la couche de surface native (le mucus) et d'autre part le mouvement de billes de latex ( $1\mu\text{m}$ ) suspendues dans un tampon de PBS et placées sur la surface de la culture immédiatement après avoir enlevé le mucus. Le mucus étant un gel quand il n'est pas cisailé, il est possible qu'il se comporte comme un solide rigide, c'est à dire que les contraintes de cisaillement soient transmises à longue portée et que son transport et sa vitesse se fassent "en masse". Par contre, le fluide newtonien ne transmet pas les contraintes de cisaillement à très longue portée et le mouvement du fluide sera plus représentatif des forces locales (écoulement à proximité des cils actifs, fluide au repos dans les zones sans cils).

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

---

Il convient d'abord de préciser quelles sont les différentes origines du mouvement qui peut être observé sur l'épithélium. Le mouvement Brownien des billes est limité car les billes ont une taille de  $1\ \mu\text{m}$ . Un transport lent du mucus est observé car le mucus est continuellement produit par les cellules caliciformes dans la chambre de culture. Le mucus s'écoule très lentement du centre vers le bord de la chambre de culture où il s'accumule progressivement, sèche et doit être enlevé au moins deux fois par semaine. Ce mouvement radial est très lent et est détecté seulement après plusieurs heures d'observation. Il ne perturbe donc pas la détection du transport de mucus induit par la poussée exercée par le battement ciliaire.

Nous avons observé deux situations. Soit un transport macroscopique quasi-circulaire du mucus sur toute la chambre de culture, le mucus étant décollé des parois circulaires du bord de la chambre, soit du mucus immobile dans toute la chambre de culture, bien que des cils actifs soient visibles sous la couche du mucus de surface. Nous décrivons ces deux mouvements caractéristiques.

#### 3.3.1.1 Transport sur l'ensemble de la chambre de culture

Un tel mouvement est montré dans la figure.3.6.A,B, où des débris cellulaires et des billes fluorescentes présents dans le mucus permettent d'imager le mouvement de ce dernier. Le mucus se déplace circulairement en masse comme une plaque rigide à vitesse angulaire constante. Sa vitesse à la périphérie de la chambre atteint des valeurs de l'ordre de  $25\text{-}270\ \mu\text{m/s}$  similaire à la vitesse physiologique dans les voies respiratoires ( $30\text{-}330\ \mu\text{m/s}$ ) (Seo et al., 2014). Les périodes de rotation sont présentées dans le tableau.3.2.

Le mucus étant viscoélastique, la réponse rhéologique du mucus (plutôt solide ou plutôt fluide) à l'action des cils n'est pas bien connue et il n'est donc pas facile d'interpréter ce mouvement. On peut penser que la réponse du mucus est de type rigide, les cils appliquant un couple sur la couche de mucus. On peut aussi penser que la réponse du mucus est visqueuse et qu'il existe alors une organisation spécifique de forces locales générant un écoulement à vitesse angulaire constante.

Nous avons remplacé le mucus natif par du tampon PBS (viscosité similaire à l'eau). Nous avons enlevé le mucus, lavé la surface de la chambre au DTT pour casser les ponts di-sulfures du mucus afin de l'enlever efficacement suivi de dix lavages au PBS. Nous avons ajouté des billes fluorescentes ( $1\mu\text{m}$ ) au PBS et nous avons suivi ensuite le mouvement de ces billes individuelles.

Il est frappant de constater qu'un mouvement à vitesse angulaire constante similaire à celui du mucus a été observé sur l'ensemble de la chambre de culture (*figure.3.7.A*). Le mouvement de plaque rigide persiste bien que le système soit fluide. La vitesse des billes augmente linéairement avec la distance au centre de la chambre (vitesse angulaire constante) comme illustré dans la *figure.3.7.B*.

Le mouvement circulaire n'est pas très surprenant. Il respecte la symétrie de la chambre de culture et il satisfait à la contrainte de lignes de courant fermées dans la chambre de culture. Le mouvement à vitesse angulaire constante,  $\Omega$ , est plus surprenant, il suggère une forte organisation des forces localement appliquées par les cils afin d'assurer que la vitesse  $V$  dans la chambre augmente linéairement avec la distance au centre de l'écoulement :  $V = \Omega.r$ . Il est intuitif de penser que les forces exercées par les cils augmentent en s'éloignant du centre du cercle afin d'entraîner le fluide à une vitesse croissante.

Après avoir décrit les cas où le mucus reste immobile, nous reviendrons sur les forces en mesurant l'activité ciliaire sur des anneaux concentriques à différentes distances du centre de la chambre.

### 3.3.1.2 Transport local

S'il n'y a pas de mouvement circulaire du mucus sur l'ensemble de la chambre, il reste immobile bien que des cils battent sous la couche de mucus.

Afin de voir si les battements de touffes ciliaires peuvent générer un mouvement directionnel, nous avons de nouveau éliminé le mucus (DTT + lavage au PBS) et suivi le mouvement des billes individuelles ( $1\mu\text{m}$ ) diluées dans du PBS.

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

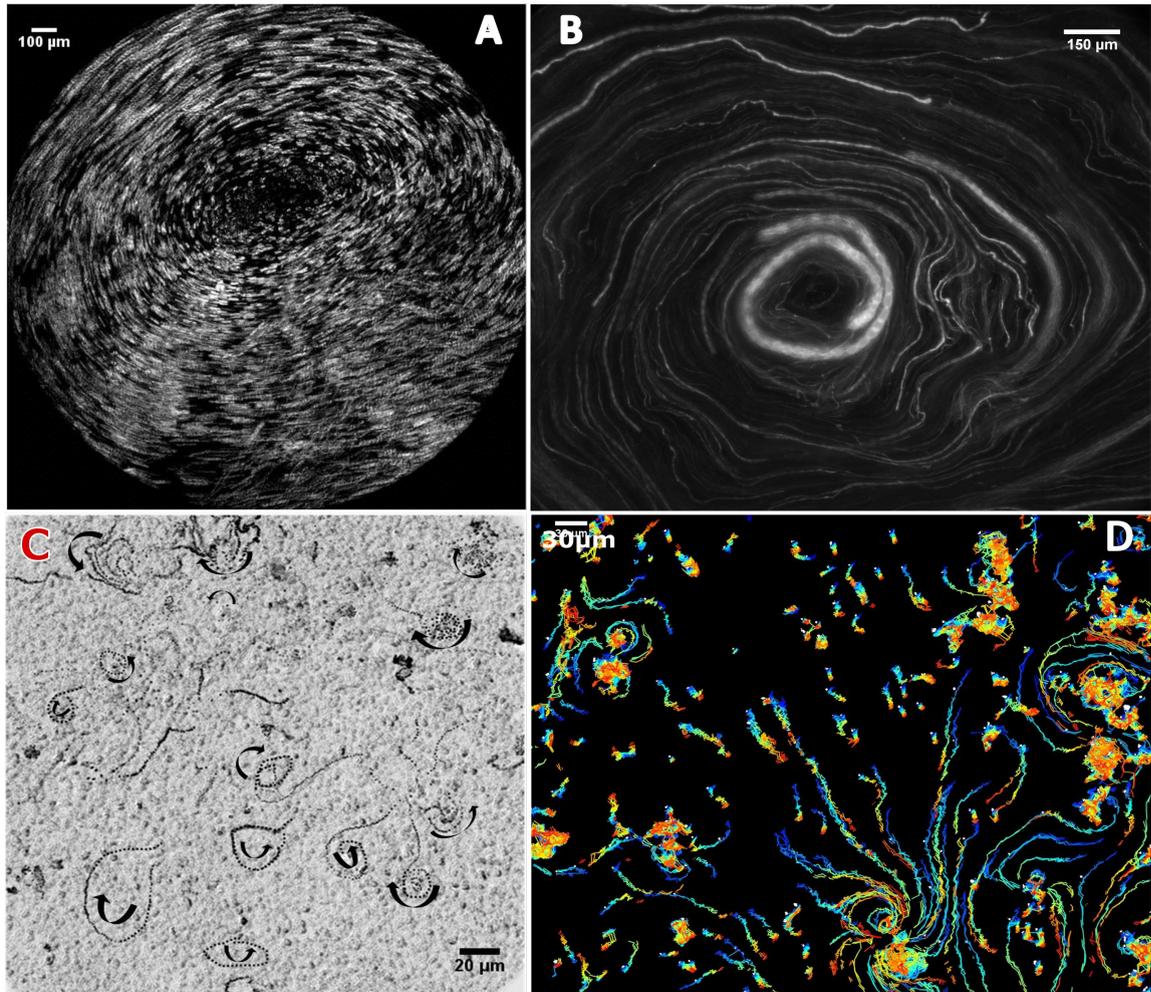


FIGURE 3.6 – Superposition d’une pile d’images prises à des moments différents montrant : La rotation du mucus sur l’ensemble de la chambre de culture en suivant (A) le mouvement des débris cellulaires présent dans le mucus ( $T=285$  s), ou (B) des billes fluorescentes. Le transport local des billes (après avoir enlevé le mucus) est observé sur des petits domaines linéaires et circulaires par (C) microscopie à transmission et (D) microscopie à fluorescence. Chaque couleur correspond à la trajectoire d’une bille.

Tableau 3.2 – Tableau détaillé des domaines circulaires. T (Témoin) ; AL (Asthme Léger) ; AS (Asthme Sévère).  $V_{max} = \frac{2\pi}{T} R_{max}$

Sujets	Groupes	Vortex analysé	$R$ ( $\mu\text{m}$ )		$T$ (s)		$V^{max}$ ( $\mu\text{m/s}$ )	$\langle\% \text{cils}\rangle$	$\langle\text{CBF}\rangle$ (Hz)	$C^{mucus}$ (%)	Intensité MUC5AC	rotation	
			$R^{min}$	$R^{max}$	$T^{min}$	$T^{max}$						+	-
1	T	35	3	23.5	30	210	1.3	8	18	0.83	107	19	16
2	T	16	8	63	20	185	4.8	9.1	16.5	1.5	128	6	10
3	T	12	2	7.5	30	300	0.6	4.3	18.4	1.7	148	6	6
4	T	1	165		440		4.8	13.4	17.2	/	/	1	
5	T	1	6000		250		250	27.4	19.1	1.5	18.5		1
6	T	1	6000		190		198	39.1	20.7	/	91		1
7	T	1	6000		185		205	32.9	17.2	/	/		1
8	$T_{EPTX}$	1	3250		285		71	71.4	13.1	/	/	1	
9	$T_{EPTX}$	1	3250		240		85	72.3	13.4	/	/	1	
10	AL	14	2	62.7	35	220	0.9	10	21.7	1.67	101	10	4
11	AL	1	6000		1800		21	27.7	17.8	/	149		1
12	AL	1	6000		140		269	35.4	15.1	/	89	1	
13	AS	1	70		34		12.9	5.4	15.5	/	/		1
14	AS	5	3	34	75	390	0.6	6	16.2	/	179	4	1

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

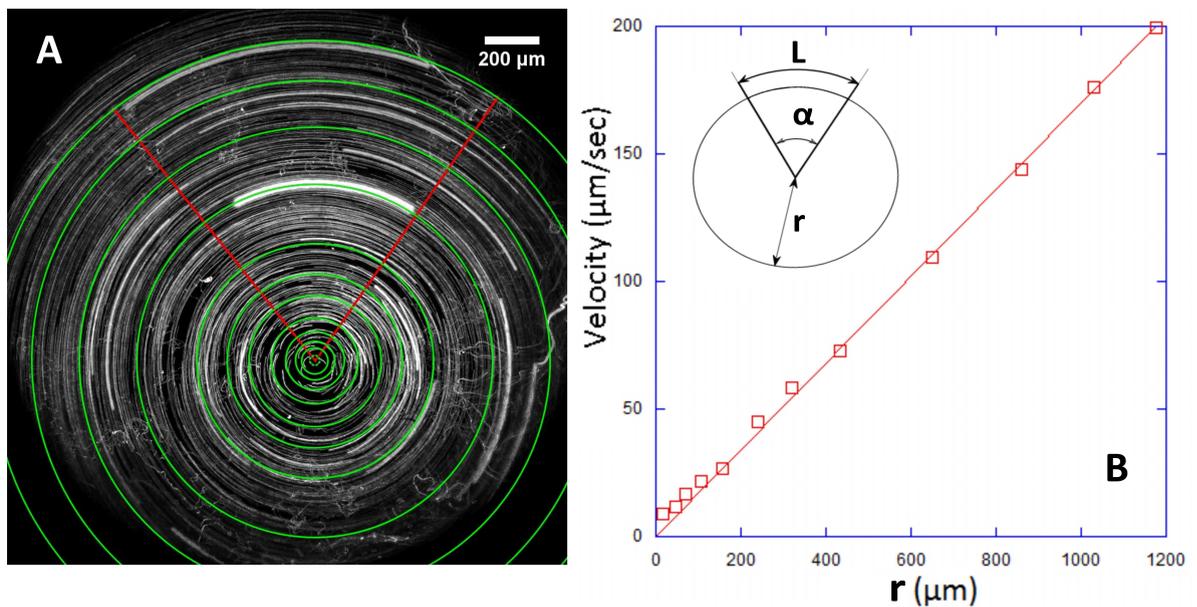


FIGURE 3.7 – Le transport des billes dans les cultures. (A) Mouvement de rotation des billes fluorescentes ( $1 \mu\text{m}$ ). L'image présentée est une superposition de plusieurs images acquises pendant 6 secondes, les traces blanches représentent les chemins parcourus par des billes individuelles. (B) Vitesse des billes fluorescentes calculée à partir de la distance curviliéaire parcourue par unité de temps mesurée sur le montage (A) est tracée en fonction de la distance radiale au centre de rotation (rayon en  $\mu\text{m}$ ). Sur le montage (A) les cercles en vert correspondent aux trajectoires sur lesquelles les vitesses ont été mesurées et représentées sur la courbe (B).

### ***Transports locaux observés : trajectoires, domaines***

Les trajectoires typiques de billes fluorescentes sont présentées dans la figure.3.6.C,D. Globalement le transport est très différent de celui observé lorsque le mucus est transporté à l'échelle de la chambre de culture. Si certaines billes sont immobiles, d'autres présentent un mouvement dirigé pouvant atteindre plusieurs centaines de microns. Nous avons relevé deux mouvements typiques : un mouvement linéaire ou pseudo-linéaire et un mouvement circulaire.

Les mouvements linéaires sont généralement observés lorsque la répartition des touffes ciliaires sur l'épithélium est inhomogène et forment des zones allongées (*figure.3.8.C*). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au transport du fluide sur des domaines circulaires ou quasi-circulaires.

Ces domaines circulaires peuvent être nombreux dans une chambre donnée et ont une taille typique pour chaque chambre de culture. Ils sont observés sur des zones épithéliales sur lesquelles la répartition de touffes de cils est homogène (*figure.3.8.A,B*). Il est intéressant de noter que des domaines générant des mouvements de rotation de billes dans le sens horaire et anti-horaire ( $\sim 50\%$  tournent à gauche et  $\sim 50\%$  à droite) peuvent coexister au sein d'une même chambre de culture, révélant ainsi que les zones de transport circulaire sont non-corrélées et sont associées à des cils battant dans des directions différentes.

Le mouvement circulaire local des billes suspendues dans le PBS est similaire à celui observé sur l'ensemble de la chambre discuté précédemment : il est caractérisé par un mouvement "rigide" à vitesse angulaire constante.

### ***Taille de domaines d'écoulements circulaires***

Les rayons des domaines d'écoulement circulaire varient de quelques dizaines de microns (quelques touffes de cils) (*figure.3.9*) à des centaines de microns (*figure.3.10*) et à l'ensemble de la chambre de culture (rayon 6 mm). Nous avons représenté la taille du plus grand domaine de transport circulaire sur chaque chambre de culture en fonction  $\varphi$  mesuré sur l'ensemble de la culture (§.3.2.1).

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

---

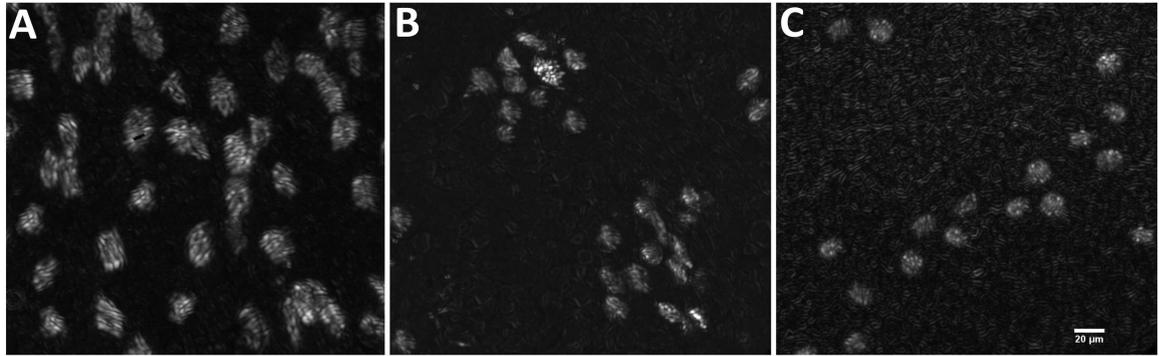


FIGURE 3.8 – Images représentatives en microscopie à transmission montrant les touffes de cils mobiles avec différentes répartitions spatiales (A) homogènes (B) agglutinées et (C) alignées.

Le résultat important est qu’une loi d’échelle est obtenue, comme représentée dans la figure.3.11, sur plus de trois ordres de grandeur. La courbe rassemble toutes les données expérimentales obtenues pour le transport local de billes mais aussi pour le transport de mucus à l’échelle de l’ensemble des chambres de culture. De plus, la courbe s’extrapole de manière remarquable aux résultats rapportés dans la littérature sur la trachée en estimant que la longueur caractéristique de transport du mucus dans la trachée est de l’ordre de la dizaine de centimètres<sup>1</sup>.

Dans notre cas la taille maximale du domaine est l’ensemble de la chambre de culture de rayon égal à 6 mm. Nous avons systématiquement observé un mouvement de rotation macroscopique du mucus lorsque  $\varphi$  était au-dessus de 20% de la surface de l’épithélium. Ce pourcentage, qui reste assez faible montre qu’un transport à l’échelle du centimètre ne nécessite pas la présence d’un tapis dense de cils.

Il est intéressant de noter que nous n’avons jamais observé de taux de couverture de surface par les touffes de cils actifs ( $\varphi$ ) très supérieur à 20%, limite pour laquelle le transport macroscopique (la clairance) est possible dans nos chambres de cultures. Est ce que le système mucociliaire s’adapte pour assurer le nombre

---

1. La longueur de la trachée varie entre 8,5  $\mu\text{m}$  et 11  $\mu\text{m}$  chez l’adulte (Begum et al., 2009) pour des pourcentages de cils entre 42% et 56% ((Raman et al., 2009)) ((Staudt et al., 2014))

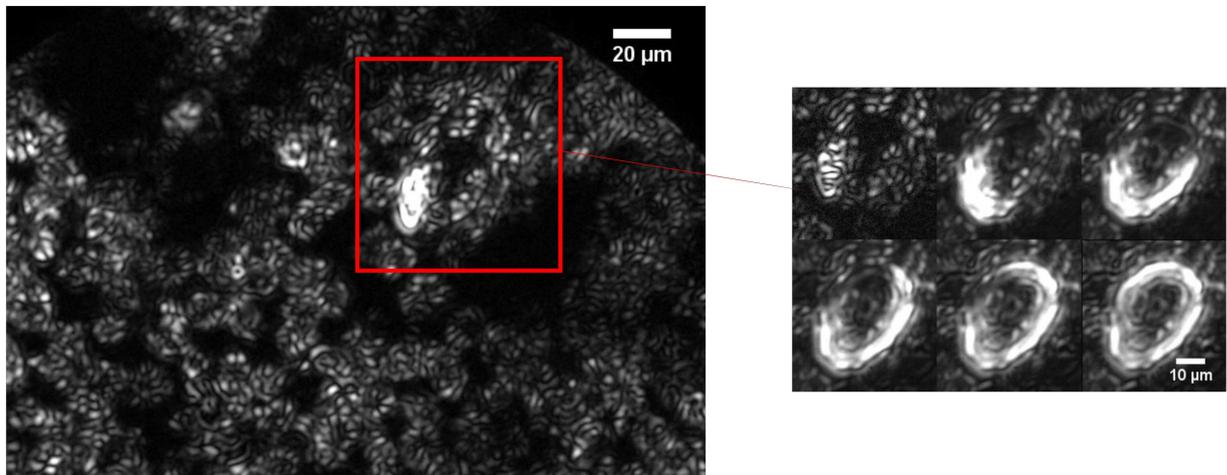


FIGURE 3.9 – Exemple de domaines circulaires sur quelques touffes de cils. A droite, la superposition des images avec des intervalles de 1,5 sec montrant la formation du domaine circulaire.

minimal de touffes actives nécessaire pour générer la clairance à l'échelle du système? Cela expliquerait que nous n'avions pas observé de  $\varphi$  de l'ordre de 50% comme dans la trachée car le système n'avait pas besoin de créer plus de touffes ciliaires actives. Nous n'avons pas eu le temps de tester d'autres dimensions de chambre de culture pour explorer cette hypothèse.

### 3.3.1.3 Conclusion

En conclusion nous avons montré :

- Que les modèles d'épithélium reconstitués ALI permettent le transport de la couche de surface (mucus viscoélastique) et de fluide Newtonien à l'échelle macroscopique de l'ensemble de la chambre de culture. L'écoulement a la symétrie circulaire de la chambre et est caractérisé par une vitesse angulaire constante. Ces résultats suggèrent une forte organisation spatiale des forces de poussée exercées par les cils battants.
- Qu'en absence de transport de mucus, les touffes ciliaires exercent des forces générant des écoulements de fluide Newtonien permettant un transport sur des domaines quasi-circulaires localisés et indépendants les uns de autres, à vitesse angulaire constante.
- Qu'une loi d'échelle, valable sur près de 4 ordres de grandeur corrèle la

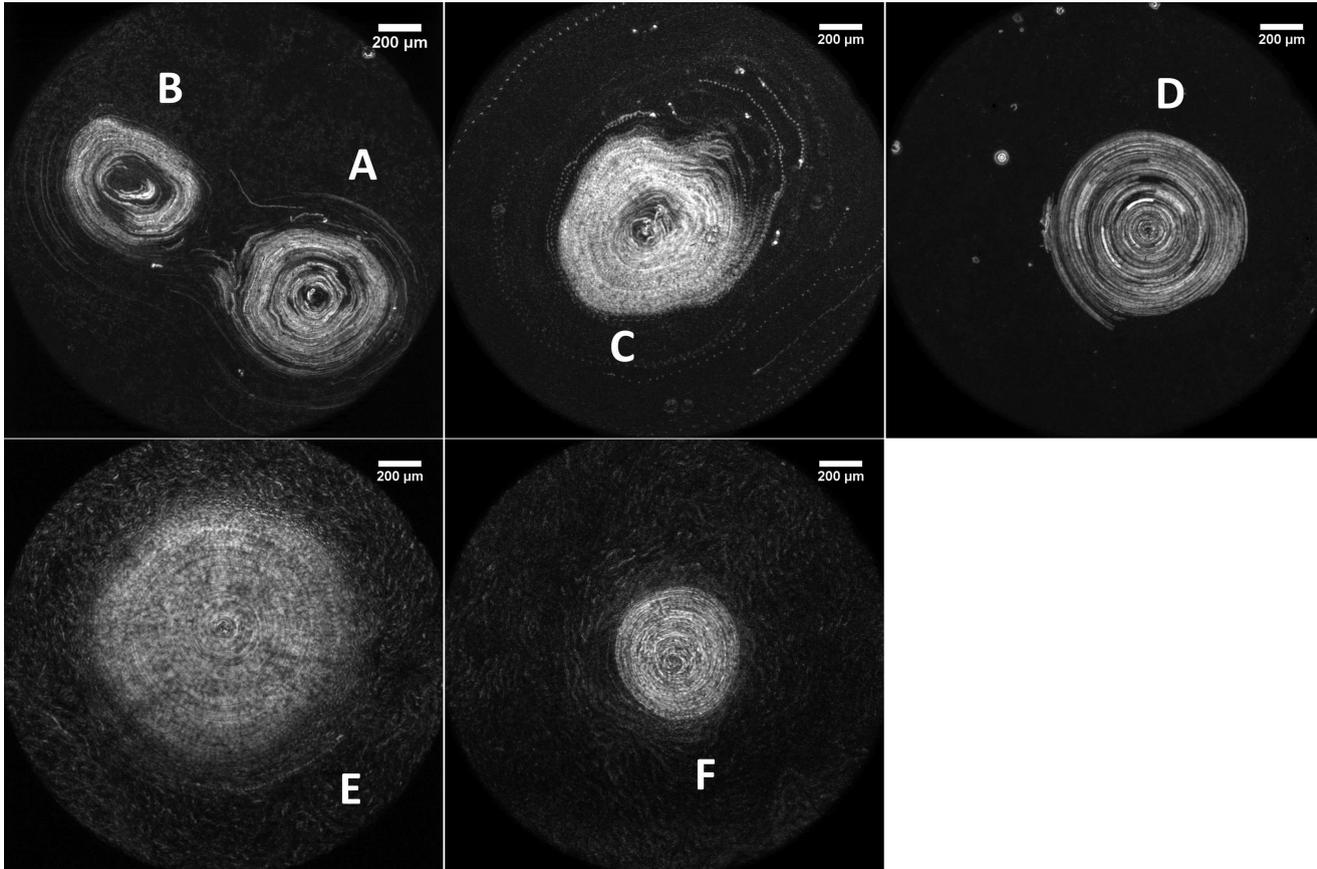


FIGURE 3.10 – Superposition d’une pile d’images pour différents domaines circulaires. La durée d’acquisition pour chaque pile d’images est de 20 sec (A et B), 100 sec (C), 6s (D), 200 sec (E) et 80 sec (F). Les domaines A (diamètre ( $d$ ) =  $345\mu\text{m}$ , période de rotation ( $T$ ) = 155 s), B ( $d$  =  $270\mu\text{m}$ ,  $T$  = 107 s), C ( $d$  =  $540\mu\text{m}$ ,  $T$  = 270 s) et D ( $d$  =  $410\mu\text{m}$ ,  $T$  = 50 s) appartiennent à des cultures jeunes et les domaines E ( $T$  = 283 s) et F ( $T$  = 461 s) à des cultures matures provenant de chez Epithelix. Pour visualiser le mouvement du mucus dans les cultures matures, nous avons mis des billes sur la couche de mucus au bout de 24 heures.

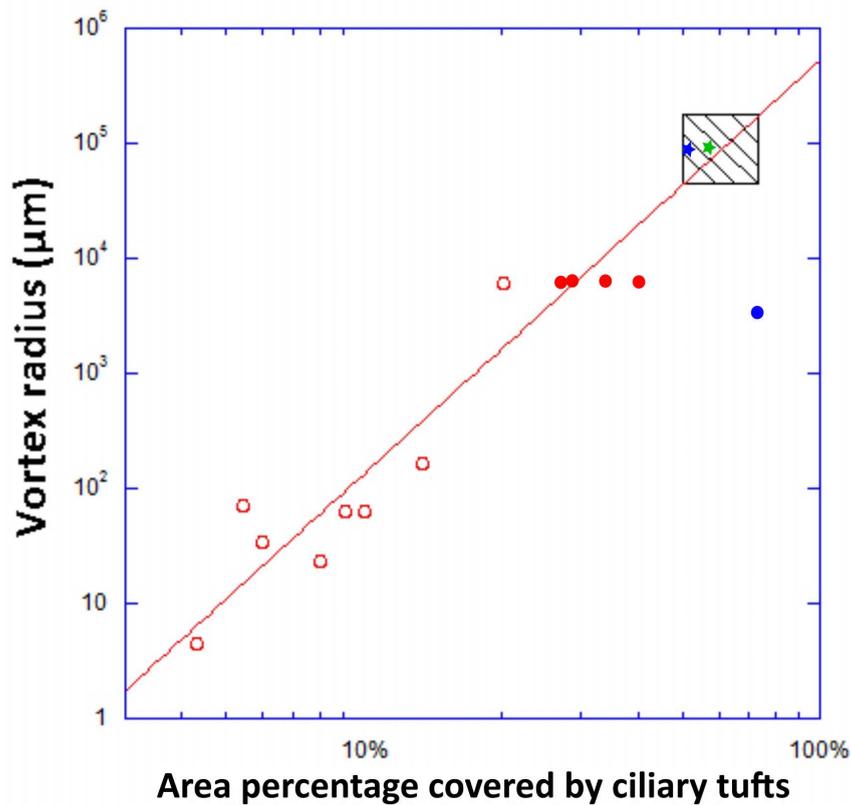


FIGURE 3.11 – Corrélation entre la taille typique des domaines (rayon en  $\mu\text{m}$ ), sur lesquels on observe un écoulement circulaire à vitesse angulaire constante et le pourcentage de la surface épithéliale occupée par les touffes de cils actives  $\circ$ . Les cercles pleins rouges  $\bullet$  correspondent aux chambres ALI dont le pourcentage est supérieur à 20% et le cercle plein bleu  $\bullet$  correspond à un échantillon Epithélix. Le cadre haché regroupe le pourcentage des cils dans les voies respiratoires humaines rapporté dans la littérature avec deux exemples dans la trachée représentés par des étoiles  $\star$  (Staudt et al., 2014)  $\star$  (Raman et al., 2009).

taille de ces domaines de transport au taux de surface recouverte par les touffes ciliaires actives. La courbe s'applique de l'échelle de quelques touffes ciliaires à l'échelle de la trachée et il est remarquable que des données physiologiques et les données sur épithéliums reconstitués se placent sur une courbe maitresse.

#### 3.3.2 Force de poussée : organisation spatiale des touffes ciliaires et dynamique des battements des cils

Comme nous l'avons soulevé, l'écoulement circulaire d'un fluide Newtonien à vitesse angulaire constante suggère que les forces locales exercées sur le fluide soient spécifiquement organisées. Cette organisation n'est pas simple à prédire car les interactions hydrodynamiques sont fortes et complexes, bien que les touffes ciliaires soient espacées les unes des autres (seulement 20% de surface occupée par ces touffes pour un écoulement circulaire de 6 mm de rayon). De nombreuses questions se posent :

Comment le système assure une zone centrale dans laquelle le fluide ne bouge pratiquement pas ? Comment évolue la force de poussée lorsqu'on s'éloigne du centre de la culture ? Comment les cellules ciliées communiquent entre elles pour assurer la correcte organisation des forces locales ? Pourquoi le système choisit-il un mouvement à vitesse angulaire constante ? Est-ce pour minimiser les contraintes de cisaillement du fluide ? Le mucus viscoélastique est-il à l'origine de l'organisation des forces locales à grande échelle ?

Nous ne répondrons pas à toutes ces questions mais pour mieux comprendre l'organisation de la poussée locale, nous avons visualisé les touffes ciliaires et analysé le mouvement de battement des cils sur les domaines circulaires où le transport était observé (*figure.3.12*).

Pour des questions de disponibilité de cultures, cette étude a été réalisée sur des cultures commerciales issues d'échantillons humains (contrôles) provenant de la compagnie Epithelix. Les chambres de culture font 6.5 mm de diamètre. Ces chambres présentent un fort taux de couverture de surface par les cellules ciliées (plus de 65%) et présentent un mouvement circulaire du mucus et des billes suspendues dans le PBS étendu à l'ensemble de la chambre.

Pour pouvoir étudier l'organisation ciliaire lorsque les domaines de transport sont uniquement localisés (billes dans PBS) nous avons demandé à Epithelix de nous fournir des cultures jeunes (avant leur date normale de commercialisation) pour lesquelles l'épithélium est déjà formé mais le taux de cellules ciliées actives

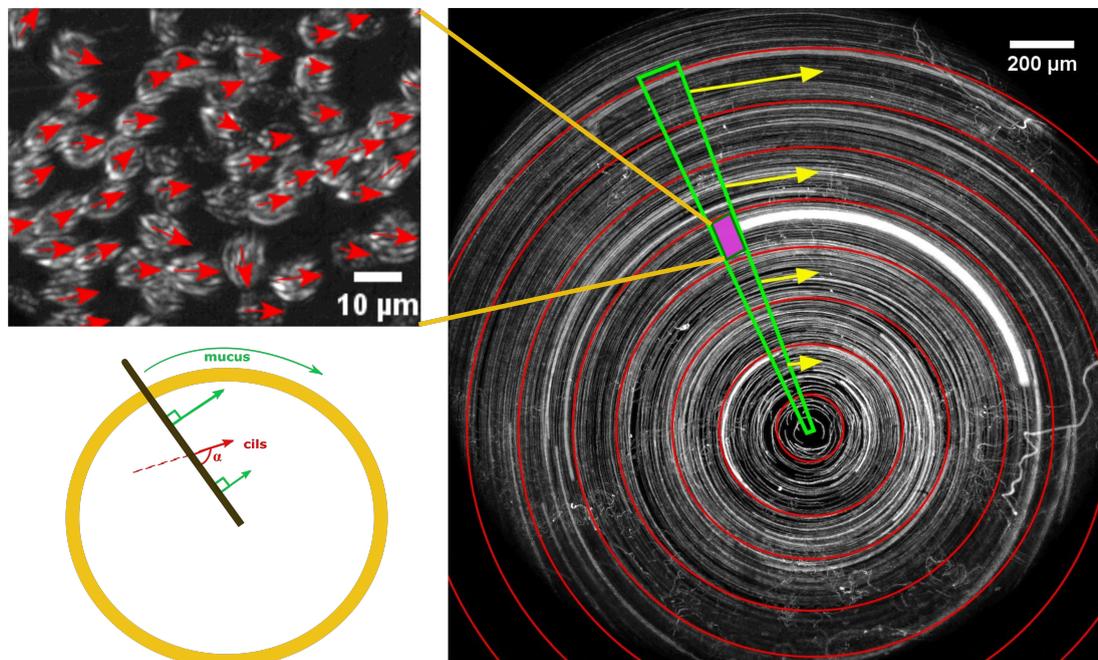


FIGURE 3.12 – Analyse de la direction de battement des cils dans les domaines circulaires. Le domaine circulaire est découpé en plusieurs zones (zone violette) à différentes distances du centre de la rotation. Dans chaque zone, la direction des touffes ciliaires est déterminée (flèches rouges) par l'angle  $\alpha$  par rapport à la direction radiale (trait noir) perpendiculaire à la direction du mucus (flèches vertes).

est encore faible.

Nous avons étudié 6 domaines circulaires observés dans 3 cultures Epithelix, jeunes en début d'apparition des cils actifs (A, B<sup>2</sup>, C et D) et dans 2 cultures matures avec une surface épithéliale recouverte de cils actifs répartis d'une façon homogène (E et F) (figure.3.10).

Nous n'avons pas mesuré les forces appliquées localement par les cils. Une hypothèse raisonnable est que chaque touffe ciliaire génère une force de poussée constante, approximativement la même pour toutes les touffes ciliaires,  $f$ . La force exercée par unité de surface et par unité de temps dépend alors linéairement du nombre de touffes ciliaires actives par unité de surface,  $\nu$ , et de la fréquence moyenne de battements ciliaires,  $\omega$ . De plus, la direction de battement

2. Les domaines A et B appartiennent à la même chambre de culture

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

---

des cils donne la direction de la poussée. La composante importante de la force est celle qui est dans la direction de l'écoulement, c'est à dire la direction tangentielle (*figure.3.12*). On considère donc que la force de poussée exercée par unité de temps et par unité de surface épithéliale située à une distance  $r$  du centre du domaine sur lequel le transport est observé s'écrit :

$$\sum_{i=1}^N f \sin(\alpha_i) \omega_i \quad (3.1)$$

Où  $\alpha_i$  est l'angle entre la direction moyenne de battement des cils de la touffe  $i$  et la direction radiale,  $\omega_i$  est la fréquence moyenne de battement de la touffe  $i$  et  $N$  est le nombre de touffes ciliaires sur l'élément de surface unitaire (voir *figure.3.12*). Si on considère que la fréquence de battement ciliaire est la même pour toutes les touffes d'un même domaine, la formule se simplifie en :

$$f \omega \nu \langle \sin \alpha \rangle \quad (3.2)$$

où  $\langle \sin \alpha \rangle$  représente l'orientation moyenne des battements ciliaires par rapport à la direction tangentielle sur un élément de surface unitaire. La force de poussée par unité de surface et de temps dépend donc de 3 paramètres :  $\omega$  qui est constant sur l'ensemble d'une culture et varie très peu sur l'ensemble de nos cultures,  $\nu$  et  $\langle \sin \alpha \rangle$  qui peuvent varier au sein d'un domaine. Nous avons découpé chaque domaine en petits éléments de surface concentriques situés à différentes distances  $r$  du centre du domaine et nous avons mesuré  $\nu$  et  $\langle \sin \alpha \rangle$  sur chaque élément de surface comme illustré dans la *figure.3.12*.

Les résultats d'analyse des battements ciliaire pour les quatre domaines circulaires observés sur des chambres de cultures jeunes sont représentés dans la (*figure.3.13*). Nous avons représenté la variation des deux paramètres  $\langle \sin \alpha \rangle$  et  $\nu$  en fonction de la distance  $r$  sur chaque domaine, puis la variation du produit  $\nu \langle \sin \alpha \rangle$ , « force effective tangentielle ». Les deux premiers paramètres augmentent avec le rayon. Cela montre que d'une part l'orientation de la direction des battements ciliaire évolue vers une orientation tangentielle quand  $r$  augmente et d'autre part, qu'il y a plus de touffes ciliaires en périphérie qu'au centre du domaine de transport. Alors qu'aucune loi de variation claire n'est observée pour chacun des 2 paramètres.

le paramètre de « force effective »  $\nu \cdot \langle \sin\alpha \rangle$  augmente linéairement avec  $r$  sur la gamme étudiée (600  $\mu\text{m}$ ). Il est remarquable que le système combine densité de touffes ciliaires et direction des battements ciliaires pour que la « force effective » augmente linéairement avec le rayon. Les évolutions linéaires sont spécifiques à chaque domaine, chaque domaine présentant des droites distinctes (figure.3.13). Il faut noter qu'aux centres des domaines, il n'y a en général pas de cils actifs, la force étant alors égale à zéro.

Pour comprendre l'origine physique du comportement observé, on peut proposer quelques arguments dimensionnels très simplifiés. La vitesse curvilinéaire à une distance  $r$  va dépendre de la force appliquée par unité de surface dans une couche de l'ordre de la longueur d'un cil  $L_c$ . De manière similaire à un écoulement de Poiseuille dans une couche d'épaisseur  $L_c$ , la vitesse s'écrit dimensionnellement :  $V \approx \nu f \langle \sin\alpha \rangle L_c/\eta$ , où  $\eta$  est la viscosité du fluide. La vitesse curvilinéaire vaut  $V=r/T$ , où  $T$  est la période rotation et donc :

$$\nu \langle \sin\alpha \rangle \approx \frac{\eta}{L_c f} \frac{r}{T} \quad (3.3)$$

On attend donc bien un comportement linéaire entre  $\nu \langle \sin\alpha \rangle$  et  $r$ . Or le comportement observé est affine. Il s'extrapole à  $r=0$  à une valeur  $(\nu \langle \sin\alpha \rangle)_0$  qui représente une force seuil nécessaire à la génération de l'écoulement. C'est une force non efficace pour le transport qui diminue le rendement force/mouvement. La puissance de cette force est dissipée dans le système. Les paramètres gouvernant cette force seuil sont encore inconnus.

Nous avons ensuite étudié les relations entre vitesse de l'écoulement et force appliquée en traçant les variations de  $r/T$  en fonction de la force utile, :  $\nu \langle \sin\alpha \rangle - (\nu \langle \sin\alpha \rangle)_0$ . La période  $T$  a été aisément mesurée sur chaque domaine et est reportée dans la figure.3.10. Ces variations sont représentées dans la figure.3.14.

On remarque que 3 des 4 courbes obtenues sur les domaines localisés sont presque superposés, montrant ainsi que le produit  $L_c f$  est constant pour dif-

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

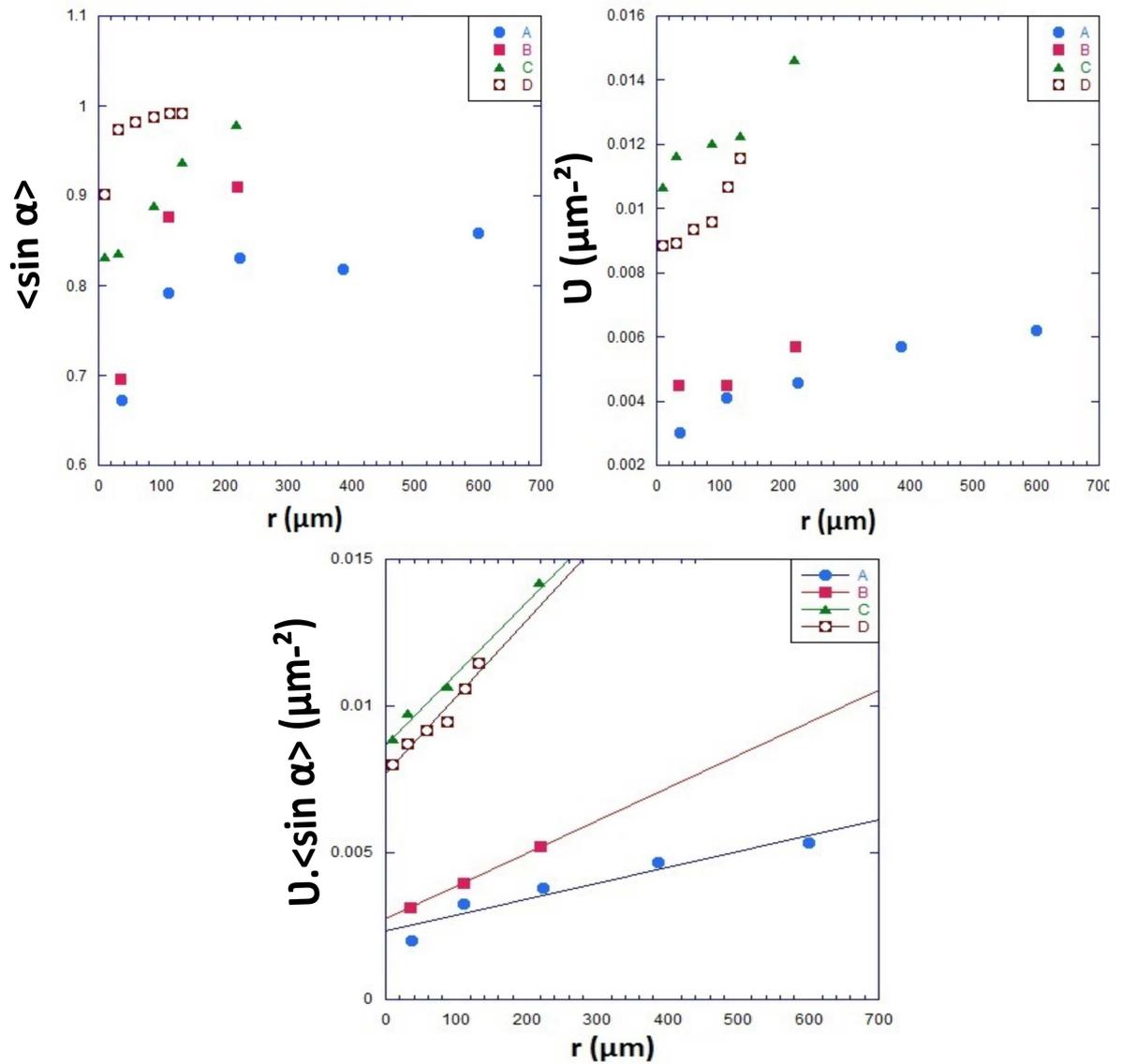


FIGURE 3.13 – Évolution des paramètres contribuant à la force de poussée en fonction de la distance au centre des domaines A, B, C et D. gauche-haut : Composante latérale de la direction des battements ciliaires  $\langle \sin \alpha \rangle$ , droit haut : nombre de touffes ciliaires actives par unité de surface  $\nu$ ; gauche-bas : force effective de poussée tangentielle  $\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle$ , droit-bas :  $\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle$  en fonction de  $r/T$  où  $T$  est la période rotation des billes sur le domaine.

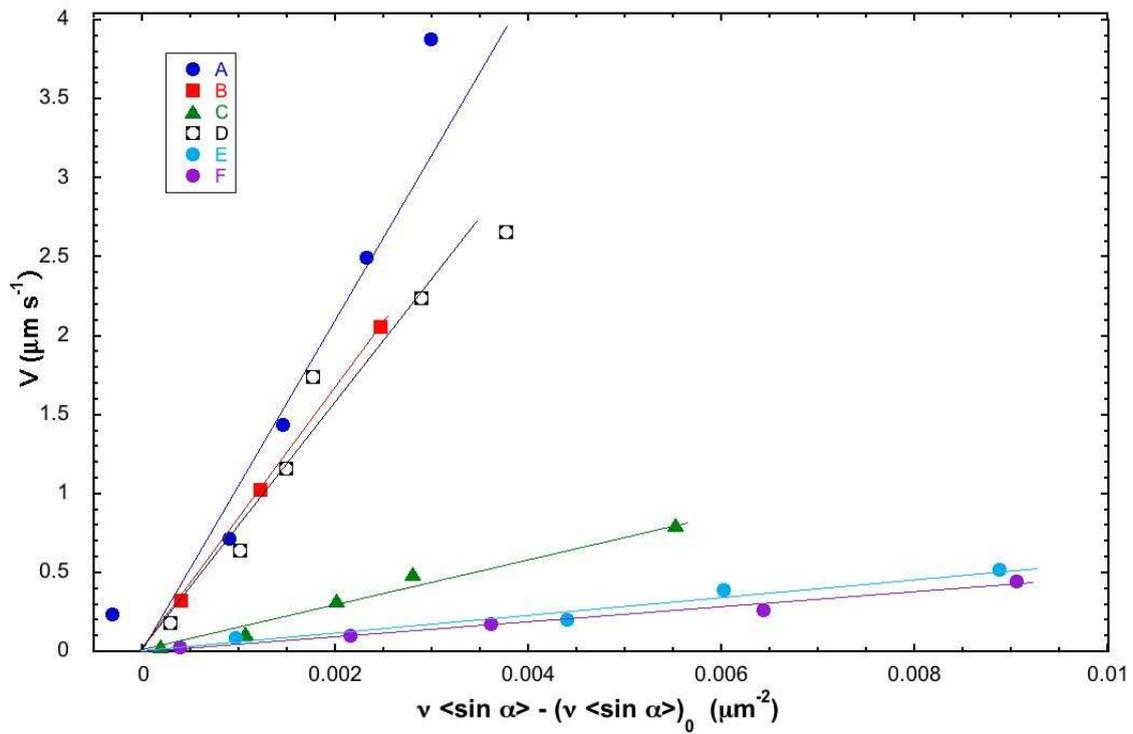


FIGURE 3.14 – Variation de la vitesse curvilinéaire sur des anneaux concentriques en fonction d'un paramètre de force utile de poussée (voir texte) pour les 6 domaines étudiés.

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

---

férentes cultures, la viscosité étant celle du tampon. L'hypothèse que la force  $f$  exercée par une touffe est une constante semble donc bien être raisonnable.

Le domaine C a un comportement différent. La vitesse augmente lentement avec le paramètre  $\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle - (\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle)_0$ . Cela pourrait éventuellement venir d'une viscosité du fluide plus grande, par exemple dûe à une plus forte densité des billes (*figure.3.14*). On ne peut néanmoins exclure que la force moyenne exercée par les touffes ciliaires,  $f$ , soit différente dans cette chambre de culture de celle des 2 autres chambres et affecte donc la pente de la droite.

Nous soulignons que la relation entre vitesse du fluide et force exercée n'est pas aussi simple que celle donnée dans la formule (3.3) car les interactions hydrodynamiques entre cils au sein d'une touffe ciliaire et entre touffes ciliaires sont complexes. Les simulations numériques montrent par exemple qu'à force constante, la vitesse d'un fluide entraîné par le mouvement d'un réseau dense de cils dépend du déphasage entre les battements ciliaires, la vitesse du fluide augmentant avec la création d'une onde métachronale<sup>3</sup>.

Nous avons conduit la même analyse sur les cultures matures E et F (*figure.3.15*). Nous observons le même type de comportement pour les paramètres  $\langle \sin \alpha \rangle$  et  $\nu$ , et le même comportement linéaire pour le produit  $\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle$ , représentatif de la force exercée par unité de surface. Les deux courbes sont presque superposées, montrant que les forces seuils  $(\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle)_0$  ne sont pas très différentes pour les deux cultures. Elles sont aussi du même ordre de grandeur de celles observées précédemment sur les domaines localisés.

Les variations de la vitesse curvilinéaire en fonction de la "force utile"  $\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle - (\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle)_0$  sont quasiment superposées pour les deux domaines E et F observés sur des cultures matures (*figure.3.14*). Ici aussi, la viscosité et la force appliquée par touffe ciliaire semblent identiques sur les deux cultures. Les deux cultures ont le même comportement de transport : même force seuil (même rendement) et même poussée ciliaire  $f$ . La pente des droites de ces cultures est

---

3. Dans nos cultures, nous n'avons pas observé de corrélation de phase des battements ciliaires entre touffes ciliaires différentes. Une onde métachronale peut exister au sein d'une touffe, mais la mesure du mouvement des cils individuels n'est pas accessible par notre méthode.

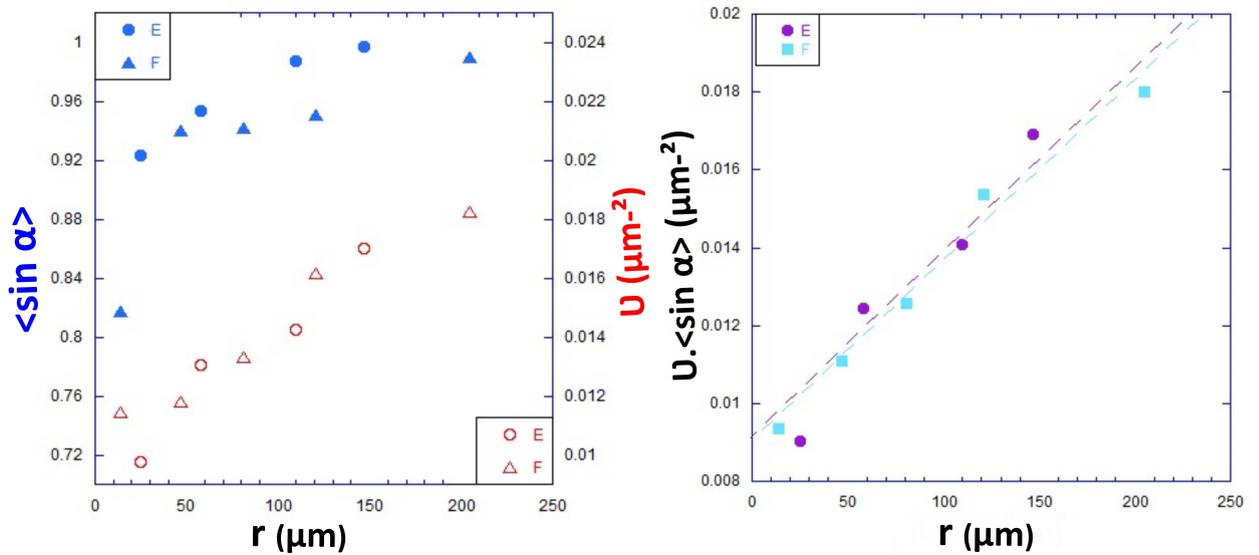


FIGURE 3.15 – Évolution des paramètres contribuant à la force de poussée en fonction de la distance au centre des domaines étendus E et F. gauche : Composante latérale de la direction des battements ciliaires  $\langle \sin \alpha \rangle$  et nombre de touffes ciliaires actives par unité de surface  $\nu$  ; droit : force effective de poussée tangentielle  $\nu \cdot \langle \sin \alpha \rangle$ , E et F.

presque 20 fois plus petite que celle des domaines A, B et D. Cela révèle soit que la force de poussée des touffes ciliaires de ces deux cultures matures est plus faible que celles des touffes ciliaires jeunes, soit que la viscosité n'est pas la même. La deuxième hypothèse semble la plus juste. En effet, dans les domaines E et F observés dans des cultures matures le mucus a été laissé se produire pendant 24 heures et les billes ont été ajoutées par dessus pour pouvoir suivre son mouvement. De plus, les mesures rhéologiques du mucus dans nos cultures à faible taux de cisaillement présentent une viscosité de mucus de  $\sim 15$ -30 fois celle de l'eau. Nous revenons en détails sur les mesures rhéologiques du mucus plus tard.

Nous avons donc montré que le mouvement circulaire à vitesse angulaire constante présents à l'échelle locale ou sur l'ensemble des chambres de culture est associé à une très forte organisation des forces locales appliquées par le battement ciliaire. Ces forces augmentent linéairement avec la distance au centre de l'écoulement mais il existe une force seuil, non efficace pour la vitesse de transport qui doit être exercée pour induire l'écoulement. La force est organisée par

### 3.3 Clairance : Le transport de fluide sur les épithéliums reconstitués

---

la combinaison ad hoc des deux paramètres orientation locale des battements ciliaires et densité locale des touffes ciliaires.

Ce résultat montre que ces deux paramètres sont régulés par le système. Dans notre système d'étude, les phases des battements ciliaires (à l'origine des ondes métachronales) ne sont pas corrélées entre touffes ciliaires différentes et ne semblent donc pas jouer sur le transport. On peut penser que l'orientation locale des battements est induite par les contraintes appliquées par le fluide en écoulement circulaire qui va finir par forcer la direction du mouvement. La densité locale des touffes ciliaires résulte de la différenciation cellulaire et des mécanismes de ciliogénèse, ce qui est un phénomène biologique. On peut se demander quelle est la nature du signal qui va moduler la différenciation ciliogénèse. Cela pourrait-il être un signal mécanique qui par mécanotransduction influencerait sur la différenciation cellulaire et/ou la ciliogénèse ?

Pour répondre à cette question nous avons suivi l'établissement du transport macroscopique lors de la maturation des épithéliums reconstitués.

#### 3.3.3 Rôle du mucus sur l'organisation de la force de poussée

Nous avons utilisé deux chambres cultures ALI jeunes en provenance d'Epithelium au début de l'apparition des touffes de cils actives et nous avons étudié l'évolution du transport du mucus sur 4 jours. Nous avons laissé le mucus sécrété par les cellules s'accumuler dans la première chambre alors que nous avons quotidiennement enlevé le mucus et lavé la surface de l'épithélium au PBS dans la seconde chambre de culture.

La première chambre ne présentait pas de transport actif de mucus le premier jour. Nous avons seulement observé un lent transport radial du mucus, du centre vers la périphérie de la chambre (*figure.3.16.A*) comme expliqué précédemment en raison de la production permanente de mucus. Au bout de 4 jours, le nombre de touffes de cils actives a augmenté et nous avons eu une coordination d'ensemble des cils avec mouvement circulaire du mucus (plateau) à une vitesse angulaire constante sur l'ensemble de la chambre de culture (6 mm de diamètre) (*figure.3.16.B*).

Dans la seconde chambre, le mucus était enlevé et la surface épithéliale lavée chaque jour. Après lavage nous placions une solution de billes diluées dans du PBS sur la surface de l'épithélium pour suivre leur mouvement. Après 4 jours, nous n'avons pas observé de transport sur l'ensemble de la chambre de culture. Nous n'avons observé quelques domaines localisés sur lesquelles les billes présentaient un mouvement circulaire.

Ce résultat suggère que l'apparition de domaines localisés sur lesquels orientation des battements ciliaires et densité de touffes ciliaires se coordonnent pour générer le transport d'un fluide Newtonien ne nécessite pas la présence permanente d'un fluide viscoélastique à la surface. De plus, quand le mucus est présent, il n'est pas transporté sur ces domaines. Comme on a vu que la taille de ces domaines dépendait de la densité moyenne de cils, on peut penser que l'interaction entre cils joue un rôle sur cette coordination. Les touffes ciliaires ne sont néanmoins pas jointives, surtout dans les petits domaines pour lesquels la densité de touffes ciliaire est faible. On peut néanmoins suggérer qu'une interaction hydrodynamique qui est l'origine de l'écoulement sur le domaine peut être à l'origine de l'existence de ces domaines. En particulier si le mucus de surface est immobile, la couche périciliaire peut présenter un écoulement local.

En revanche, la fusion des domaines localisés en un domaine étendu sur l'ensemble de la culture nécessite une présence continue de mucus. Cela suggère un rôle mécanique important lié à l'élasticité du mucus qui transmet les contraintes de cisaillement à longue portée. Lorsque qu'un domaine a frottement grand, il impose un couple à l'ensemble du mucus qui va commencer à tourner. Les domaines voisins vont subir les contraintes hydrodynamiques associées à ce mouvement et vont rectifier la direction de battement des cils pour minimiser les contraintes de cisaillement. Le taux de touffes ciliaires évolue aussi car une zone déplétées en cils apparaît au centre de la chambre de culture et la densité de touffes ciliaires augmentent en fonction de la distance radiale au centre. Ce phénomène est directement lié à la différenciation cellulaire et la ciliogénèse. On peut suggérer que différenciation et ciliogénèse sont sensibles à la force visqueuse appliquée par le mucus. Cette force, qui s'exerce sur les cils, serait retransmise ensuite en signal biologique par un effet de mécanotransduction, encore peu

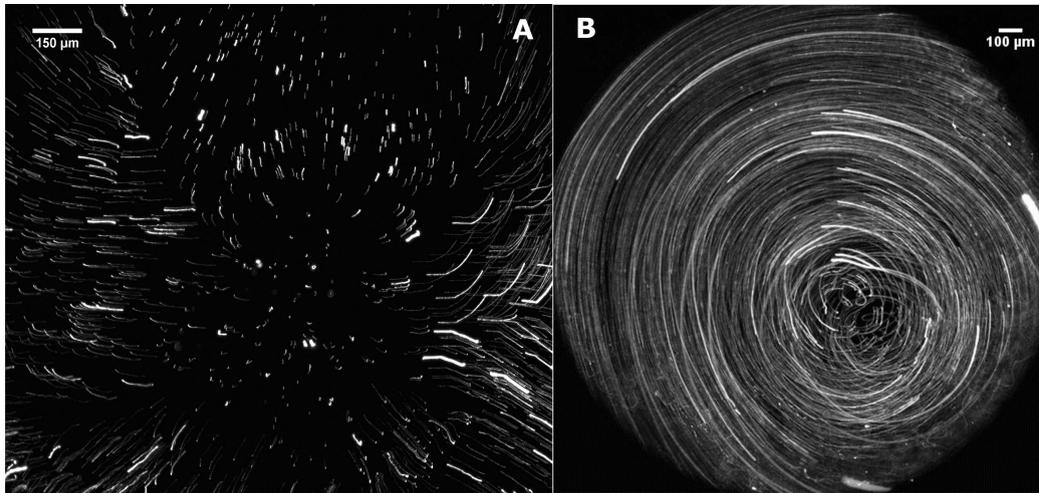


FIGURE 3.16 – Effet du mucus sur la coordination. (A) Écoulement radial lent du mucus de surface visualisé par des billes fluorescentes immergées dans le mucus, allant du centre vers les côtés. Ce mouvement est observé au début de l'apparition des cils et est dû à la sécrétion en permanence du mucus. La durée d'acquisition de la pile d'images est de 2 heures. (B) Ecoulement (transport) circulaire sur l'ensemble de la chambre de culture après quelques jours et l'apparition des touffes ciliaires actives sur l'ensemble de la culture. La durée d'acquisition de la pile d'images est de 80 secondes.

identifié et peu étudié.

#### 3.3.4 Synthèse, remarques et interrogations

Nous avons montré que la distance sur laquelle le mucus ou un fluide Newtonien pouvaient être transportés dépendait directement du taux de couverture de l'épithélium par les touffes ciliaires actives. La loi d'échelle est hautement non linéaire. Elle pourrait être liée à la probabilité d'avoir des domaines plus denses en cils sur l'épithélium. Il est important de noter que le transport macroscopique à l'échelle du centimètre ne nécessite pas un tapis dense de cils. Les domaines sur lesquels du transport a lieu minimisent le cisaillement horizontal du fluide. Cela se traduit par un mouvement circulaire à vitesse angulaire constante à toutes les échelles d'espace de nos chambres de culture. Pour cela, les cils adaptent leur direction de battement et leur densité locale. Pendant la maturation de l'épithélium et le développement des cellules ciliées, il est nécessaire de fusionner les petits domaines organisés en un macrodomaine permettant le transport à l'échelle de

l'échantillon entier. Pour cela, la présence du mucus viscoélastique est nécessaire, suggérant que les contraintes mécaniques imposées par l'écoulement sur l'épithélium jouent un rôle majeur, non seulement pour imposer la direction de battement ciliaire mais aussi pour réguler la densité locale en cellules ciliées et son organisation spatiale. En particulier, il y a peu de cellules ciliées au centre de l'écoulement. Un phénomène de mécanotransduction est suspecté, qu'il faudra explorer.

Nous souhaitons faire quelques remarques.

D'abord, le tapis de cils est peu dense et la distance inter cils entre touffes voisines est très supérieure à la taille des cils. La conséquence est que nous n'avons pas observé d'ondes métachronales à l'échelle de plus de quelques microns (intra-cellule ou entre cellules ciliées immédiatement voisines). Ce phénomène ne joue donc pas de rôle majeur dans le transport dans notre système.

On peut s'interroger sur le taux de couverture des touffes ciliaires actives et sur le rôle de la fréquence de battement des cils car ces deux paramètres présentent une différence notable entre les mesures sur la trachée et sur nos modèles. On a déjà remarqué que le taux de couverture des touffes ciliaires actives se situait sur la courbe maîtresse en loi d'échelle suggérant que ce taux s'adaptait à la distance de transport qui était nécessaire. La fréquence jouerait-elle un rôle sur la vitesse de transport ? Les vitesses de transport trouvées à la périphérie de nos chambres de culture sont du même ordre de grandeur que celle observée *in vivo* alors que les dimensions de nos chambres de culture sont plus petites. Est ce que les forces de poussée sont plus efficaces ? Nous avons montré que la force de poussée par unité de surface et de temps (puissance par unité de surface) s'écrivait comme  $f\omega\nu < \sin\alpha >$ . Nous avons calculé le produit global  $\omega\nu$  et vitesse linéaire à la périphérie pour 4 chambres de culture (5, 6, 7 et 12, tableau 3.3). Les vitesses sont dans la gamme 150-270 microns par seconde et le produit  $\omega\nu$  dans la gamme 5-8, ces valeurs étant similaires à celle observées pour la trachée (vitesse dans la gamme 150-250  $\mu\text{m/s}$ ,  $\omega\nu = 6$  pour  $\omega$  de l'ordre de 12 Hz et  $\nu$  de l'ordre de 50%). En revanche sur les domaines localisés, la vitesse linéaire est beaucoup plus faible et le rapport  $\omega\nu$  plus faible. Si la densité de touffes ciliaires permet le transport sur la distance requise, la fréquence permet d'adapter

### 3.4 Pathologies et clairance mucociliaire

---

la vitesse de mucus pour atteindre une vitesse "satisfaisante" de l'ordre de 200 microns/s. Dans le cas de nos cultures, il n'est pas utile d'avoir une forte densité ciliaire car les parcours de transport sont courts. En revanche, il faut compenser par la fréquence (18Hz au lieu de 10 à 12Hz dans la trachée) pour atteindre la vitesse de clairance correcte.

En définitive, la densité de cellules ciliées se fixe au minimum nécessaire selon la distance à parcourir et la fréquence s'ajuste pour obtenir la vitesse nécessaire à une bonne clairance. Localement, densité et orientation ciliaires s'ajustent pour assurer un transport à faible cisaillement.

Enfin, jusqu'à présent, nous n'avons pas étudié le rôle des propriétés rhéologiques du mucus sur le transport. Nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe suivant dédié aux pathologies. Nous souhaitons à présent explorer le rôle que joue l'activité ciliaire dans les pathologies et si ce paramètre a un effet sur l'altération de la clairance mucociliaire observée.

### 3.4 Pathologies et clairance mucociliaire

Nous allons étudier l'effet des maladies : l'asthme léger (AL), l'asthme sévère (AS) et la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) sur les paramètres de l'activité ciliaire mais aussi sur les propriétés rhéologiques du mucus pour voir s'ils peuvent être la cause des problèmes de clairance.

#### 3.4.1 Pourcentage de surface de l'épithélium occupé par les touffes ciliaires actives et transport

Nous montrons sur 17 témoins, 7 patients atteints d'asthme léger, 18 patients atteints d'asthme sévère et 7 patients avec la BPCO que le pourcentage de surface de l'épithélium occupé par les touffes ciliaires actives ( $\varphi$ ) diminue au fur et à mesure que la sévérité de la maladie augmente. Ce paramètre  $\varphi$  passe de 16% pour le groupe témoin à 14,2% pour l'asthme léger (non significatif), 5,5% pour

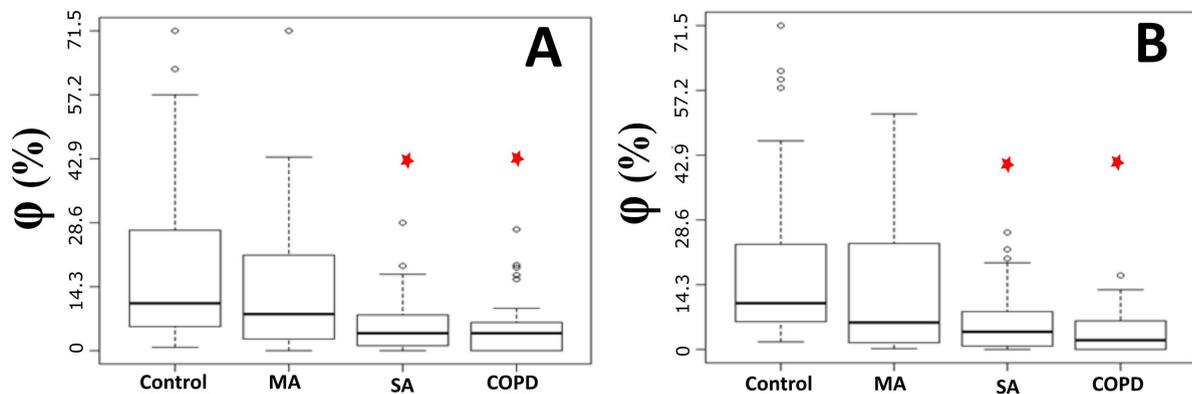


FIGURE 3.17 – Pourcentage de la surface de l'épithélium recouvert par les touffes ciliaires actives ( $\varphi$ ) des cultures épithéliales bronchiques à l'interface air-liquide, pour le groupe contrôle, asthme léger (MA), asthme sévère (SA) et la broncho pneumopathie chronique obstructive (COPD). (A) en présence du mucus et (B) après avoir enlevé le mucus. Les résultats sont exprimés sous forme de médianes et inter-quartiles avec 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles. MA ( $P < 0,7$ ), SA ( $*P < 0,0005$ ) et la BPCO ( $*P < 0,015$ ). Modèle à effet aléatoire.

l'asthme sévère ( $*P = 0,0032$ ) et 3,95% pour la BPCO ; ( $*P = 0,0168$ ). Les résultats sont montrés dans des box plot (boîtes à moustache) dans la (figure.3.17).

Le déficit important en touffes de cils actifs observé dans l'asthme sévère et la BPCO peut être dû, soit à un déficit de touffes ciliaires, soit à la non activité des cils sur les touffes (dyskinésie) soit aux deux. Pour répondre à cette question, nous avons marqué par une sonde fluorescente les cils des épithéliums ALI vivants et nous avons combiné la microscopie optique à transmission, la microscopie de fluorescence et la microscopie confocale comme décrit précédemment (§.3.2.1).

En plus d'un plus faible pourcentage de surface occupée par les touffes ciliaires dans les sujets malades, nous avons trouvé que le pourcentage moyen de touffes de cils actifs diminue dans l'asthme sévère. En effet 58,4 % des touffes de cils sont inactifs chez les patients asthmatiques sévères (5 sujets) contre 19,5 % chez les témoins (6 sujets) ;  $*P < 10^{-16}$  ; (figure.3.3). Nous avons également mesuré le pourcentage de touffes de cils inactives pour l'asthme léger uniquement sur deux patients. Ce pourcentage est de 50%.

### 3.4 Pathologies et clairance mucociliaire

---

Pour les asthmatiques sévères, le taux de couverture de surface de l'épithélium par les touffes ciliaires actives est toujours inférieur à celui requis pour observer un transport sur l'ensemble de la chambre et effectivement, nous n'avons jamais observé de transport de mucus sur les cultures des asthmatiques sévères. La taille maximale des domaines locaux sur lesquels des billes dans du PBS étaient transportées n'excédaient pas 150  $\mu\text{m}$ .

La clairance est donc fortement altérée chez les asthmatiques sévères par la faible densité de touffes ciliaires actives.

Comment évolue la fréquence de battements qui, comme nous l'avons vu, joue sur la vitesse du mucus ?

#### 3.4.2 Fréquence de battement des ciliaire

Nous avons mesuré la fréquence de battement des cils (CBF) pour les différents groupes. En présence de mucus, nous n'avons observé aucune différence significative de la fréquence médiane de battement des touffes de cils en fonction de la maladie. Cependant, il y a une petite tendance à la baisse car la CBF médiane diminue de 18,2 Hz chez les témoins (n=17) et asthmatiques légers (18,3 Hz)(n=7) à 16,6 Hz chez les asthmatiques sévères ( $P < 0,07$ ) (n=18) et à 17,7 Hz chez les patients avec la BPCO ( $P < 0,7$ ) (n=7) (*figure.3.18*).

Après l'élimination de la couche de mucus suivie d'un lavage au PBS, une légère diminution de la fréquence médiane des battements de touffes de cils a été observée pour les trois maladies, mais elle n'est significative que pour l'asthme sévère *figure 3.18*. En effet, la CBF médiane diminue de 19,7 Hz dans le groupe témoin à 18,1 Hz dans l'asthme léger ( $P < 0,2$ ), à 17,6 Hz dans l'asthme sévère ( $*P < 0,014$ ) et à 18,3 Hz dans la BPCO ( $P < 0,27$ ) (*figure.3.18*). Enfin nous avons mesuré la CBF en immersion (Cf annexe.1).

En outre, il s'avère que la fréquence de battement est beaucoup plus dispersée à la fois pour les patients atteints d'asthme léger ; l'écart type (SD) égal à 4,4 Hz ( $*P = 10^{-6}$ ) et pour les patients atteints d'asthme sévère, SD = 4.2 Hz ( $*P = 10^{-7}$ ) que pour les contrôles sains ; 3,2 Hz. Ces résultats de dispersions de fréquences

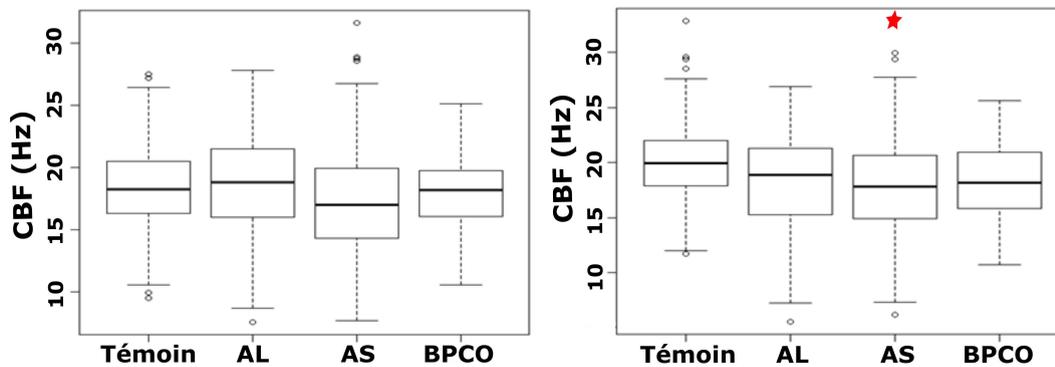


FIGURE 3.18 – Fréquence de battement des cils dans des cultures épithéliales à l'interface air-liquide, pour le groupe contrôle, asthme léger (MA), asthme sévère (SA) et la broncho pneumopathie chronique obstructive (COPD). Gauche : mucus présent et Droite : après avoir enlevé le mucus. Les résultats sont exprimés sous forme de médianes et inter-quartiles avec 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles. MA ( $P < 0,2$ ), SA ( $*P < 0,01$ ) et BPCO ( $P < 0,27$ ), Modèle à effet aléatoire.

sont observés avant et après avoir enlevé la couche de mucus.

La fréquence de battement est peu affectée mais ce n'est pas ce paramètre qui joue sur la distance de transport. Ce paramètre joue sur la vitesse de transport, mais bien sûr, le transport est nécessaire d'abord et la fréquence ne compense pas la densité ciliaire.

### 3.4.3 Mucus

Enfin on peut se demander si les propriétés physiques du mucus sont affectées dans l'asthme sévère et pourraient jouer un rôle additionnel dans l'altération de la clairance mucociliaire. Le mucus pathologique peut-il inhiber l'activité ciliaire et donc être responsable de la diminution des touffes de cils actives et donc altérer la clairance mucociliaire chez les groupes de malades ? Nous avons donc exploré les propriétés physicochimiques du mucus.

### 3.4 Pathologies et clairance mucociliaire

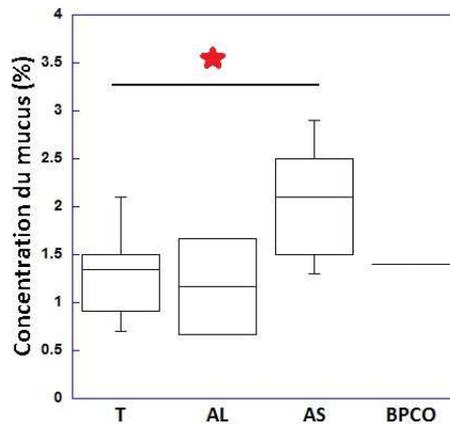


FIGURE 3.19 – Concentration du mucus pour le groupe témoins "T" 1,35 % (12 sujets), asthme léger "AL" 1,20 % (2 sujets), asthme sévère "AS" 2,10 % (5 sujets) et BPCO 1,40 % (1 sujets). \*P < 0,04 (test statistique entre le T et AS)

#### 3.4.3.1 Concentration de mucus

Nous avons mesuré la concentration de mucus (poids/poids) récupéré à la surface de nos cultures, sur 12 sujets contrôles, 2 asthmatiques légers (AL), 5 patients atteints d'asthme sévère (AS) et 1 BPCO (§.2.2.0.5). Nous trouvons une concentration médiane de mucus de 1,35 % pour les sujets sains, 1,20 % pour l'asthme léger, 2,10 % pour les asthmatiques sévères et 1,40 % pour la BPCO (figure 3.19). Cette différence est significative entre les deux groupes "témoins et AS" (\*P < 0,042). La valeur trouvée reste néanmoins dans la limite pour laquelle la pression osmotique exercée par le mucus équilibre la pression osmotique exercée par la couche périciliaire (Button et al., 2012). Il n'y a donc pas d'écrasement des cils par la couche de mucus de surface, comme cela est observé dans le cas de la mucoviscidose.

#### 3.4.3.2 Propriétés rhéologiques du mucus

De plus de sa concentration, les propriétés rhéologiques du mucus sont aussi très importantes pour assurer le bon fonctionnement de l'escalator mucociliaire (comme nous l'avons évoqué dans §.1.5). Nous avons développé une collaboration avec Gladys MASSIERA (LCC, UM2) (ANR Mucocil). Dario Donnarumma et Gladys MASSIERA ont mesuré les propriétés rhéologiques du mucus prélevé sur nos cultures dans un rhéomètre cône-plan. Différents groupes de malades ont

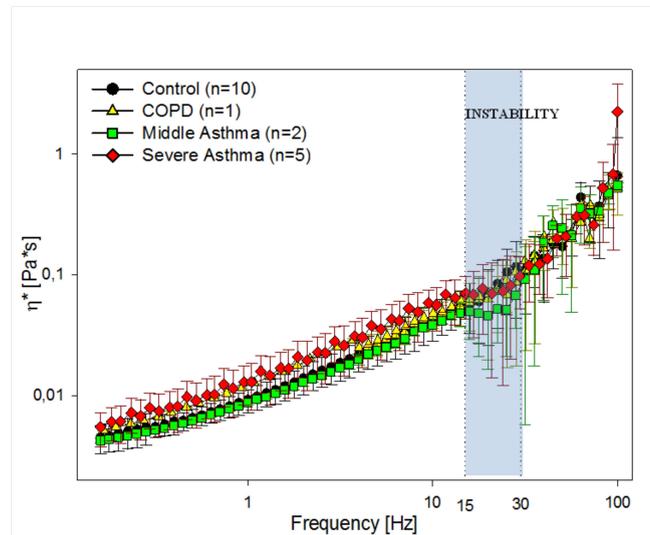


FIGURE 3.20 – Viscosité complexe  $\eta^*$  (Pa.s) du mucus pour le groupe contrôle (N=10), AL (N=2), AS (N=5) et BPCO (N=1) obtenues par rhéométrie à  $\sigma = 10$  Pa et  $f = 0-100$  Hz. (figure réalisée par D.Donnarumma)

été étudiés : 10 sujets contrôles, 2 asthmes légers, 5 asthmes sévères et 1 BPCO. Les résultats de la viscosité complexe ( $\eta^*$ ), du module élastique ( $G'$ ) et module visqueux ( $G''$ ) du mucus sont obtenus par rhéométrie sous contrainte imposée  $\sigma = 10$  Pa et une gamme de fréquence  $f = 0-100$  Hz. Nous n'avons constaté aucune différence significative de la viscosité complexe ( $\eta^*$ ) entre les différents groupes. Cette dernière est dans la gamme " $\eta^* \sim 0,01 - 0,1 Pa.s$ " (figure.3.20).

Le module élastique ( $G'$ ) et le module visqueux ( $G''$ ) du mucus ne présentent pas non plus, une différence significative entre les groupes. Ils restent dans la gamme de [ $G' \sim 1 - 10 Pa$ ;  $G'' \sim 5 Pa$ ] pour une contrainte imposée  $\sigma = 10$  Pa et une gamme de fréquence  $f = 0-100$  Hz (figure.3.21). De plus, aux fréquences de battement des cils (15-30 Hz), le mucus présente toujours une instabilité de comportement pour le groupe de contrôles et le groupe de patients. Les propriétés rhéologiques du mucus ne sont pas altérées sur nos modèles de culture pour les différents groupes.

### 3.4 Pathologies et clairance mucociliaire

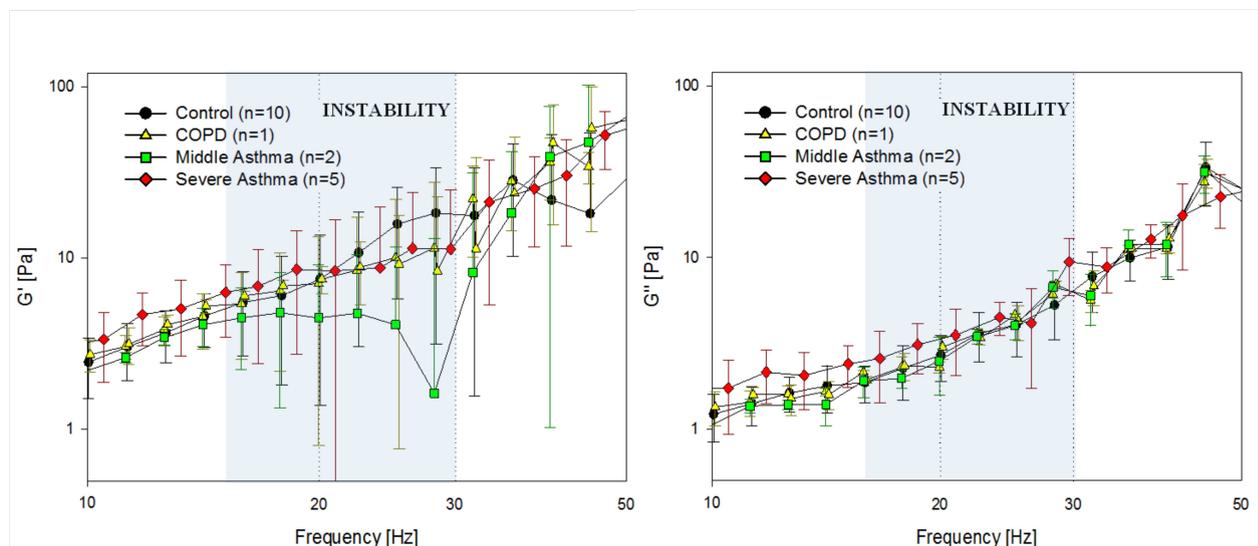


FIGURE 3.21 – Module élastique  $G'$  (Pa) et le module visqueux  $G''$  (Pa) pour le groupe contrôle ( $N=10$ ), AL ( $N=2$ ), AS ( $N=5$ ) et BPCO ( $N=1$ ) obtenus par rhéométrie à  $\sigma = 10$  Pa et  $f = 0-100$  Hz. (figure réalisée par D.Donnarumma)

Tableau 3.3 – Le pourcentage des touffes ciliaires actives sur la surface de l'épithélium ALI pour les différents groupes en présence du mucus et l'effet négatif du mucus après l'avoir enlevé suivi d'un lavage (effet du lavage).

Groupes	témoin (17)	AL (7)	AS (18)	BPCO (7)	Effet du lavage
%	15.7	14.1	5.2	4.6	+0.4
p-value	/	0.7390	0.0011	0.0137	0.2091

#### 3.4.4 L'effet du mucus sur l'activité ciliaire

Nous avons refait les mêmes expériences de mesure de l'activité ciliaire (CBF et  $\varphi$ ) après avoir enlevé la couche de mucus de chaque culture ALI (§.2.2.1). Ces expériences permettent d'explorer l'effet du mucus sur l'activité ciliaire.

Nous n'avons relevé aucune différence significative entre  $\varphi$  avant et après avoir enlevé la couche superficielle sur les cultures (tableau.3.3). Le pourcentage augmente de 0,4 % après avoir enlevé la couche de mucus pour tous les groupes mais de manière non significative ( $P < 0,21$ ).

Cependant, nous avons constaté un effet du mucus sur la fréquence de battement des touffes ciliaires (CBF). Cette dernière augmente après avoir enlevé

le mucus, de 18,2 Hz à 19,7 Hz pour les témoins, de 16,7 Hz à 17,6 Hz dans l'asthme sévère et de 17,7 Hz à 18,3 Hz pour les patients BPCO. La fréquence de battement reste stable dans l'asthme léger (*figure.3.18*).

En conclusion la concentration du mucus et ses propriétés rhéologiques ne sont pas altérées chez les asthmatiques sévères dans nos cultures. Le taux de débris et de cellules mortes peut être plus important chez les asthmatiques, ce qui peut faire augmenter artificiellement la concentration mais ces débris ont été enlevés pour les mesures de rhéométrie.

### 3.4.5 Conclusion sur l'asthme sévère

Comme on vient de le voir, la rhéologie mucus n'est pas affectée dans l'asthme sévère lorsqu'on le prélève sur les cultures non infectées et qu'on enlève les débris cellulaires. Il ne semble donc pas jouer pas de rôle délétère sur la clairance. En revanche, l'activité ciliaire est fortement dégradée et constitue une cause suffisante à l'absence de clairance.

Dans la littérature, on suggère que cette diminution peut être expliquée par la présence de l'Interleukine 13 (IL-13)<sup>4</sup>, cytokine clé dans l'asthme allergique. Certaines études suggérant qu'elle contribue à la différenciation des cellules ciliées en cellules caliciformes dans l'épithélium asthmatique (Kondo et al., 2002)(Kondo et al., 2006). Dans une étude complémentaire, la stimulation de l'épithélium ALI sain avec IL-13 a réduit significativement le nombre des cellules ciliées à 4.8% (Parker et al., 2012) ce qui correspond au pourcentage que nous avons trouvé pour les asthmatiques sévères. Cela, peut donc expliquer le manque de cils dans l'asthme sévère dans notre modèle par rapport aux contrôles.

Bien sûr, ces résultats demandent des confirmations car ils sont obtenus sur des modèles et doivent être associés à des données moléculaires mais ils sont très encourageants et accroissent nos connaissances sur la clairance mucociliaire dans l'asthme sévère.

---

4. IL-13 une cytokine sécrétée par de nombreux types de cellules, mais en particulier des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2), qui sont des médiateurs de l'inflammation allergique et de la maladie.

### 3.5 Perspectives

---

Nous n'avons pas pu caractériser le transport du fluide sur des cultures de patients BPCO (manque de temps). Cependant, nous avons relevé le même déficit du pourcentage de la surface épithéliale recouverte de touffes de cils actives que l'asthme sévère. De plus, nous avons vu que la rhéologie du mucus n'est pas affectée. Nous pensons donc que la taille maximale des domaines dans la BPCO n'excéderait pas les  $150\mu\text{m}$  et que l'altération de la clairance mucociliaire dans la BPCO est dûe au manque drastique de touffes de cils actives dans notre modèle de culture.

### 3.5 Perspectives

Travailler sur des cultures à l'interface air-liquide issues de biopsies humaines est un réel avantage pour pouvoir étudier le transport mucociliaire. Cependant, l'inconvénient majeur est la difficulté d'obtention des prélèvements. De plus, la culture de cellules primaires est difficile et nécessite environ 2 mois entre le prélèvement et l'obtention des cellules bien différenciées avec des cils qui battent. Cette étude nécessite donc beaucoup de temps pour bien la mener à terme. Les perspectives à ce travail sont :

- Contourner la limite de taille des chambres de culture pour avoir plus de points sur la courbe densité/taille des domaines. Faire des cultures sur des chambres plus grandes ou plus petites et observer la coordination.
- Modifier la géométrie des chambres de culture : rectangulaire, carrée, mettre des barrières... Et observer si le système s'adapte à la forme.
- Isoler les cellules ciliées du tapis épithélial, les remettre en culture sur une membrane et observer le développement des domaines sur des cellules isolées pour différencier les effets mécaniques et biochimiques.
- Mesurer la fréquence des battements des cils directement sur la biopsie avant de la mettre en culture puis sur la culture ALI issue de cette biopsie afin de les comparer et voir si ce sont les mêmes fréquences ou si les fré-

quences changent dans les cultures ALI pour s'adapter à l'environnement.

- Vérifier l'hypothèse de l'IL13 suspectée d'être responsable du manque drastique des cils chez les asthmatiques sévère, en faisant pousser les cellules de témoins en présence de l'IL13 et voir si au final on a reproduit des asthmatiques (à savoir est ce qu'on change la proportion de cellules ciliées, ou les fréquences ou la dispersion).

### 3.6 Études parallèles réalisées en collaboration

#### 3.6.1 La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique due à la mutation du gène codant le canal CFTR, un canal chlorure de la membrane apicale des cellules épithéliales, impliqué dans la régulation de l'hydratation du liquide péri-ciliaire (PCL : peri-ciliary layer). Son dysfonctionnement perturbe l'hydratation du mucus qui devient plus visqueux. Ceci limite son élimination par la clairance mucociliaire et entraîne son accumulation dans les voies aériennes des patients. Ce mucus anormal et non éliminé favorise le développement d'infections, en particulier par des pathogènes opportunistes. Ces pathogènes développent au fil des ans des résistances aux antibiotiques et au système immunitaire et induisent une inflammation pulmonaire chronique. Cette inflammation est caractérisée par un recrutement massif et continu de neutrophiles dans les poumons où ils sécrètent activement de l'ADN. L'ADN libéré dans les sécrétions bronchiques des patients augmente leur viscosité et altère d'avantage le transport mucociliaire.

Dans une étude en collaboration avec une équipe de Tours sous la direction de Virginie Hervé, nous avons testé l'effet d'un polypeptide cationique "la poly-L-Lysine" (pLK), sur le battement ciliaire et la clairance mucociliaire. La pLK présente la propriété de compacter l'ADN et possède des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de nombreux pathogènes. La pLK assurant également la liquéfaction des expectorations, le but était donc d'étudier si elle favorise la clairance mucociliaire et si la présence d'agrégats d'ADN (ADN compacté) ne serait pas nuisible. Pour cela, nous avons travaillé à partir d'expectorations récupérées lors

### 3.6 Études parallèles réalisées en collaboration

---

de séances de kinésithérapie chez des patients adultes atteints de mucoviscidose.

Les expectorations ont été traitées de façon à obtenir un « homogénat » plus facilement fractionnable (Ajout d'environ 2 mL de PBS par gramme d'expectoration puis vortex). Le volume de PBS dépend de la quantité de salive présente dans l'échantillon et peut être modifié pour obtenir un aspect et une viscosité compatibles avec nos mesures. Après homogénéisation, l'expectoration est transférée à la pipette dans un nouveau tube de manière à éliminer la « mousse » générée par le vortex. L'homogénat est ensuite incubé dans des microtubes à faible adsorption, à raison de 500  $\mu$ L par tube, avec de la pLK (140  $\mu$ M), de la DNase (0,4 mg/mL) ou l'équivalent en volume de PBS pour le Contrôle. L'incubation se fait à température ambiante sur une balancelle pendant 2 h avant utilisation de l'homogénat. Nous avons ensuite déposé l'homogénat non traité ou traité à la pLK ou à la DNase sur notre modèle ALI d'épithélium reconstitué (sain), à la place du mucus naturellement sécrété par les cellules. La fréquence de battement des cils et l'effet du transport ont ensuite été analysés. En ce qui concerne la quantité à déposer, nous nous sommes basés sur le volume ou la masse de mucus que nous avons habituellement, et nous avons déposé un peu plus pour mimer l'accumulation de mucus qui se produisant chez les patients avec la mucoviscidose.

Les expectorations non traitées ont diminué significativement la fréquence de battement des cils (*figure.3.22.A*). Cette CBF retourne à la normale après un traitement pLK mais pas après traitement à la DNase (*figure.3.22.A*). En effet, des touffes ciliaires ont été observées à la surface épithéliale 1 heure après l'exposition à l'homogénat des expectorations traitées par la pLK mais pas après exposition à des expectorations non traitées (*figure.3.22.B*). En outre, les agrégats ont été efficacement enlevés à la périphérie de la chambre de culture (*figure.3.22.C*). Ceci suggère que dans la mucoviscidose, le traitement pLK peut améliorer la clairance mucociliaire notamment par son effet sur le mucus. Ce travail a donné lieu à une publication scientifique dans une revue internationale (Dubois et al., 2013).

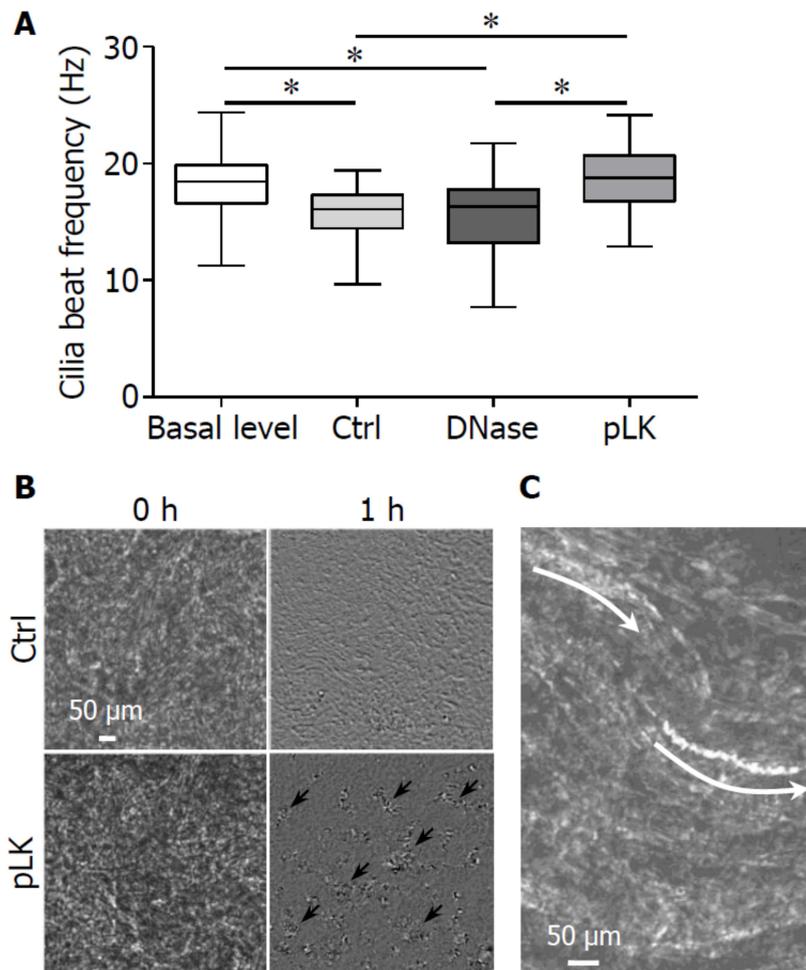


FIGURE 3.22 – Effet de la poly-L-lysine (pLK) sur l'évacuation des expectorations dans la mucoviscidose, tel que mesuré par la fréquence des battements ciliaires. (A) Mesure de la fréquence de battement des cils après le traitement de l'épithélium bronchique avec l'homogénat des expectorations non-traité (contrôle), traité par DNase (0,4 mg/ml), ou traité par la pLK (140 mM). Le niveau de base représente la CBF avant l'ajout de l'homogénat des expectorations et est utilisé comme référence. Les résultats sont exprimés en tant que l'intervalle médian et inter-quartile, avec des valeurs minimales et maximales. \* Différence significative évaluée par des modèles à effets mixtes linéaires pour des mesures répétées ( $P < 0,05$ ). (B) Des images représentatives des surfaces apicales de l'épithélium bronchique recouvertes de l'homogénat des expectorations de la mucoviscidose non traité (Ctrl) ou traité par la pLK (à gauche). Après 1 heure (à droite), des touffes ciliaires peuvent être considérées uniquement dans l'épithélium avec les expectorations traitées par la pLK (flèches noires). (C) Représentation de la circulation des agrégats des expectorations traitées par la pLK générés par l'empilement de 400 images acquises pendant 1 heure. Les traits blancs correspondent au mouvement des agrégats grâce aux battements des cils.

## 3.6 Études parallèles réalisées en collaboration

---

### 3.6.2 Les molécules pharmacologiques

Nous avons testé l'effet de plusieurs molécules pharmacologiques sur l'activité ciliaire : fréquence de battement et pourcentage des touffes de cils actives. Nous avons utilisé les molécules suivantes : GSK, 2-APB, ATP, EGTA et pour le contrôle DMSO (protocole dans le §.2.2.0.7).

La molécule "**GSK**" est un inhibiteur des canaux ORAI (3 isoformes : 1,2 et 3) : ces canaux sont des canaux membranaires sélectifs du calcium. Ils sont activés par la déplétion des stocks intracellulaires de calcium.

Le 2-Aminoethoxydiphenyl borate (**2-APB**) est un agent chimique qui inhibe les récepteurs IP3 (Diver et al., 2001) et les canaux TRP (Xu et al., 2005)(Bootman et al., 2002). Dans la recherche, il est utilisé pour modifier la libération intracellulaire d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) et l'activité du canal TRP.

L'adénosine-5'-triphosphate (**ATP**) est la molécule qui fournit par hydrolyse l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme. L'hydrolyse de l'ATP est cruciale pour le battement ciliaire.

L'**EGTA** (acide éthylène glycol-tétracétique) est un acide aminopolycarboxylique, agent chélateur du  $Ca^{2+}$ . C'est un solide incolore qui est lié à l'EDTA. Par rapport à l'EDTA, il a une plus faible affinité pour le magnésium, le rendant plus sélectif pour les ions calcium. Il est utile dans des solutions tampons qui ressemblent à l'environnement dans les cellules vivantes où les ions calcium sont habituellement d'au moins mille fois moins concentrée que le magnésium.

Le diméthylsulfoxyde (**DMSO**) est un solvant polaire organique de formule brute  $C_2H_6OS$ . Il se présente comme un liquide incolore, qui dissout à la fois des composés polaires et non-polaires, et qui est miscible dans une large gamme de solvants organiques, ainsi que dans l'eau. Il pénètre très facilement et rapidement la peau avant de diffuser dans tout l'organisme. Le DMSO a été utilisé pour dissoudre les molécules utilisées dans cette étude et constitue donc un contrôle interne.

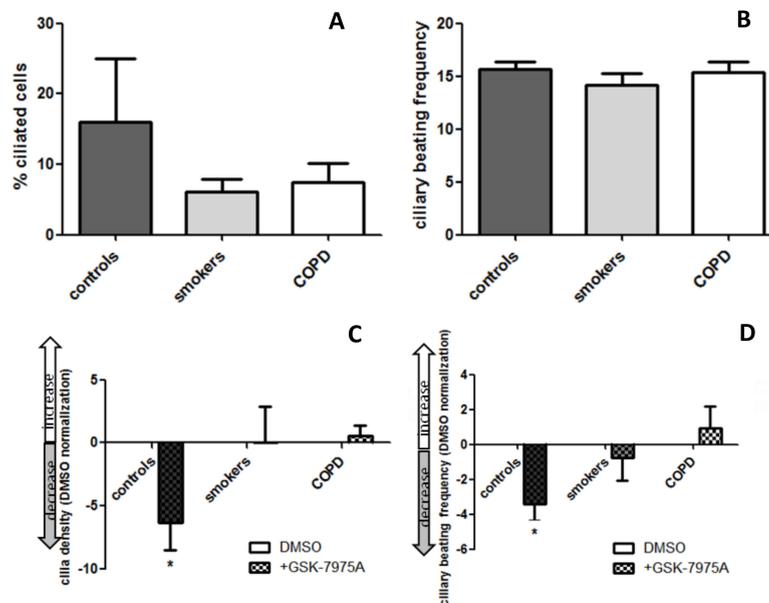


FIGURE 3.23 – Effet de l’inhibiteur des canaux ORAI sur les différents groupes : Contrôles, fumeurs et patients avec la BPCO. (A) Le pourcentage des cellules ciliées, (B) La fréquence de battement des cils. L’effet de la drogue GSK sur (C) le pourcentage de cils et (D) la fréquence de battement chez les contrôles.

L’effet inhibiteur du GSK est observé uniquement dans les cultures contrôles où nous avons une diminution significative du pourcentage de cils qui battent et de leur fréquence de battement (*figure.3.23*). Cette diminution, observée uniquement chez les contrôles peut s’expliquer par le fait que ces canaux ORAI sont déjà inhibés chez les fumeurs et BPCO. Ce qui explique le faible pourcentage chez ces patients même avant l’exposition des cultures à la drogue GSK (*figure.3.23.A*).

Nous avons observé un effet mineur de l’ATP avec une faible augmentation de la fréquence de battement des cils et de la densité des touffes de cils actives dans tous les groupes. L’effet de l’EGTA est surprenant et inattendu avec une diminution de la densité des touffes de cils actives et une dégradation de l’épithélium (*figure.3.25*). Cependant, nous n’avons pas observé d’effet de la molécule 2-APB.

### 3.6 Études parallèles réalisées en collaboration

---

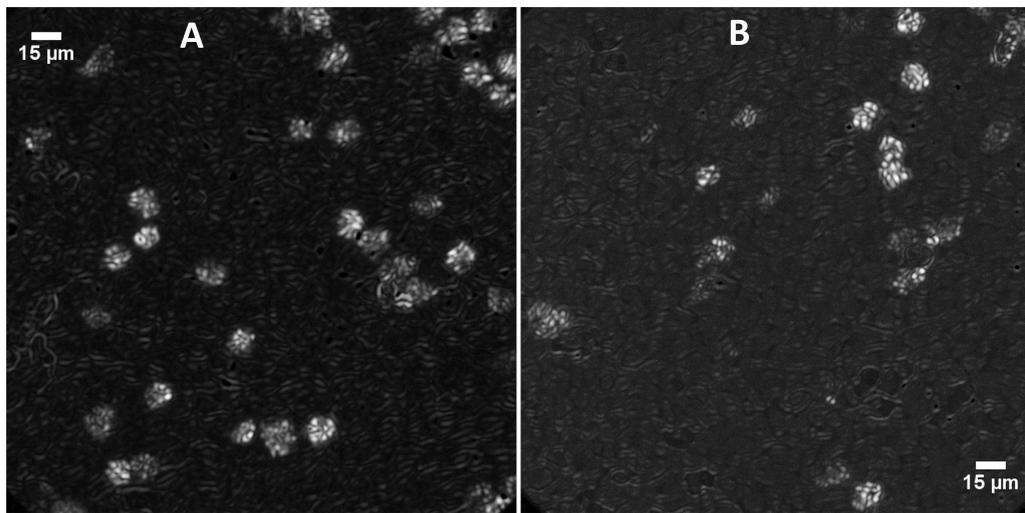


FIGURE 3.24 – Effet de l’inhibiteur des canaux ORAI sur la densité ciliaire. (A) Avant et (B) après incubation avec la molécule GSK.

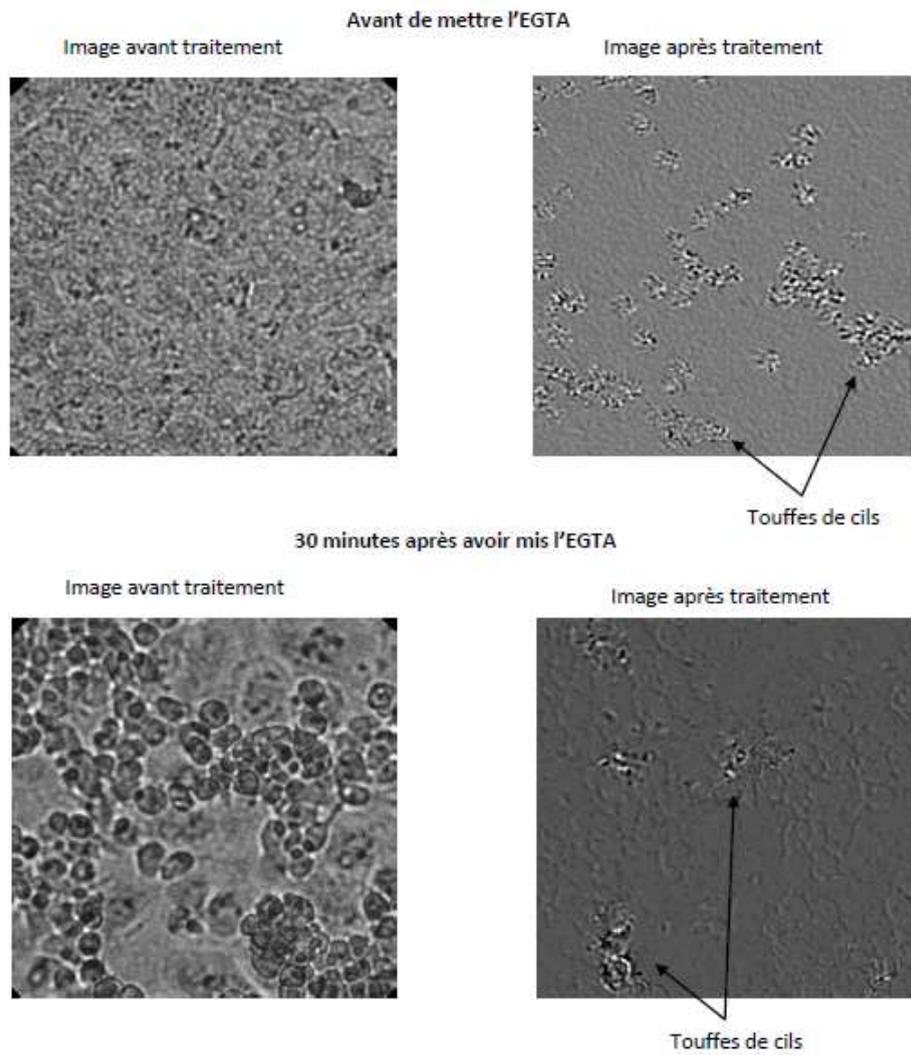


FIGURE 3.25 – Effet de la molécule EGTA sur la densité ciliaire avant et (B) après incubation avec la molécule GSK.

## Deuxième partie

# Microdispositif d'étude de la migration cellulaire 3D par chemotaxis



---

## Introduction

Dans une étude complémentaire, nous proposons un test du rôle potentiel inflammatoire de l'épithélium dans l'asthme sévère. Pour tester la puissance des marqueurs inflammatoires sécrétés dans les surnageants de l'expectoration induite ou dans les surnageants de culture de cellules épithéliales, les sécrétions seront mises en contact avec des cellules immunitaires (dendritiques / neutrophiles) confinées dans un environnement qui imite la membrane basale sous-épithéliale. Cet environnement bio-mimétique sera constitué d'un réseau de polymère à base de collagène et de matrigel commercial. La composition de cette matrice bio-mimétique peut être modifiée pour simuler le remodelage bronchique. Nous avons mis au point un système bio-mimétique après avoir développé et exploré différents types de dispositifs microfluidiques à partir d'un modèle publié dans (Liu et al., 2009).

Nous avons ensuite testé la faisabilité de ces mêmes expériences sur un système commercial provenant de chez IBIDI. Cependant, en raison de la difficulté rencontrée pour avoir une migration directionnelle des polynucléaires neutrophiles soumises à un gradient de substances chimio-attractantes dans ce système commercial, nous avons élargi le domaine d'application afin de valider le système. J'ai donc co-encadré une stagiaire (Emma Desvignes) avec qui nous avons observé la migration des polynucléaires neutrophiles et des macrophages exposés à un gradient de leishmanies dans ce dispositif commercial.

Cette étude qui vise à mettre au point un système bio-mimétique pour étudier la migration des cellules immunitaires en 3D sera décomposée en deux parties. Une première partie traitera le cas de la migration des neutrophiles et des cellules dendritiques sous l'influence de l'épithélium bronchique d'asthmatiques, et la seconde étudiera la migration potentielle des polynucléaires neutrophiles et des macrophages au cours de la leishmaniose.



# Chapitre 4

## État de l'art

### 4.1 Les cellules immunitaires impliquées dans l'asthme

#### 4.1.1 Les neutrophiles

Les neutrophiles ne sont pas abondants dans les tissus sains, mais pendant les périodes d'infection et d'inflammation, le nombre de neutrophiles augmente lorsqu'ils quittent le sang pour migrer vers ces sites. Cela est essentiel pour la défense contre l'infection, mais dans certaines conditions telles que dans les maladies respiratoires (l'asthme, la BPCO et la mucoviscidose), la présence de neutrophiles dans le tissu peut être préjudiciable conduisant à des lésions tissulaires (Chmiel et al., 2002)(Halder and Pavord, 2007).

#### 4.1.2 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont les cellules sentinelles de l'organisme. Plusieurs populations de cellules dendritiques (DC) sont décrites dans les voies aériennes. Les DC résidentes sont spécialisées dans la capture et l'apprêtement de l'antigène mais leurs capacités de présentation sont faibles avant migration dans les ganglions (Villadangos and Schnorrer, 2007). Par contre, dans l'asthme allergique les DC pulmonaires effectuent la présentation antigénique localement et jouent un rôle majeur dans l'inflammation des voies aériennes (Lambrecht et al., 1998). Le nombre et les fonctions des DC sont profondément modifiés lorsqu'il y a inflammation ou agression locale : bactérienne, virale ou allergénique (Mc-

William et al., 1994) (Jahnsen et al., 2006). Le recrutement de précurseurs à partir du sang circulant conduit à l'apparition de DC "inflammatoires", de nature myéloïde, apparentées aux DC obtenues par différenciation *in vitro* en présence d'IL-4 et de GM-CSF (Hammad and Lambrecht, 2008). Elles sont essentielles pour initier des réponses immunitaires associées à l'asthme expérimental chez la souris. Cependant, l'implication des DCs dans l'asthme humain reste moins clair.

### 4.1.3 Les chimiokines

#### IL-8

L'interleukine 8 (IL-8) ou CXCL8 est une chimiokine produite par les macrophages, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses des voies aériennes et les cellules endothéliales (Hedges et al., 2000). Les récepteurs de l'IL8 (CXCR1 et le CXCR2) sont des récepteurs membranaires présents sur plusieurs types cellulaires notamment les neutrophiles. Martin et al. ont montré que l'IL-8 est un puissant chimio-attractant physiologique des neutrophiles. Le formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) est un peptide chimio-attractant des neutrophiles et sert de chimio-attractant contrôle lors des études de migration et d'activation de ces cellules. Il est également décrit comme un activateur des macrophages.

#### CCL19 / CCL21

Le récepteur C-C type 7 ou CCR7, est le récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21. Ces cytokines sont impliquées dans la migration des cellules dendritiques vers la zone des cellules T dans les ganglions lymphatiques<sup>1</sup> (nœuds lymphatiques). Lors de l'activation, il régule à la fois la chimiotaxie, par la voie avale du MAPK et la protéine G, et la vitesse de migration, par la voie Rho / Pik2 / Colifin (*figure.4.1*). L'expression de CCR7 est renforcée après l'activation / la maturation, et est régulée par le facteur de transcription RunX3 (Förster et al., 1999)(Riol-Blanco et al., 2005)(Sánchez-Sánchez et al., 2006).

Il existe des preuves de l'implication de CCR7 dans la pathogenèse de l'asthme allergique. En 1999, Forster et al. ont montré que les souris dont CCL19, CCL21

---

1. Les nœuds lymphatiques sont le lieu de prolifération et de différenciation des cellules immunitaires. Le premier rôle des vaisseaux lymphatiques est d'amener un antigène (dans la grande majorité des cas issu d'un pathogène) du tissu jusqu'aux ganglions, afin d'activer la réponse immunitaire spécifique des lymphocytes T et B.

## 4.1 Les cellules immunitaires impliquées dans l'asthme

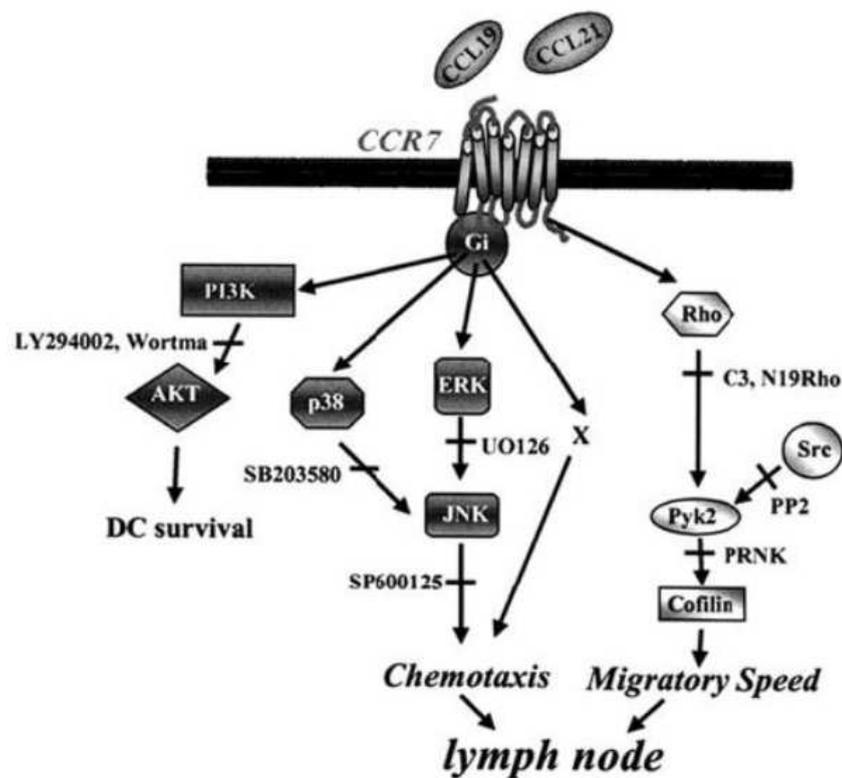


FIGURE 4.1 – Les voies en aval de CCR7 (Le récepteur des chimiokines C-C type 7).source (Riol-Blanco et al., 2005)

ou CCR7 sont génétiquement modifiés (knocked "KO"), présentes des réponses immunitaires déficientes (Förster et al., 1999). Plus tard, il a été démontré que les souris KO pour le facteur de transcription RunX3 ont une expression extrêmement élevée de CCR7 sur leurs cellules dendritiques et présentent des caractéristiques cardinales de l'asthme (une inflammation à éosinophiles et une hyper-réactivité des voies respiratoires) (Fainaru et al., 2005)(Hammad et al., 2002).

## 4.2 Les cellules immunitaires impliquée dans la leishmaniose

La leishmaniose est une maladie parasitaire transmise par un insecte, le phlébotome. En piquant, ce dernier injecte le parasite dans le derme de la peau ce qui provoque une réaction immunitaire. Les globules blancs viennent phagocyter les parasites dans le but de les détruire, mais les parasites vont déjouer le système immunitaire : ils vont se reproduire dans les globules blancs, et finiront par provoquer leur lyse. L'interaction initiale entre les globules blancs, plus particulièrement les macrophages, et les leishmanies est mal connue. En effet, nous ne savons pas si ce sont les molécules de l'inflammation (dus à la piqûre) ou celles de l'infection (dus au parasite) qui attirent les macrophages.

La leishmaniose est une maladie endémique. Quatre-vingt-huit pays sont actuellement touchés par la leishmaniose sur 4 continents (Europe, Afrique, Asie, Afrique Central et du Sud). Actuellement, 370 millions de personnes sont susceptibles d'être touchées par la maladie, 500 000 cas sont déclarés chaque année et 12 millions de Leishmanioses différentes sont déjà répertoriées<sup>2</sup>.

Le vecteur de la leishmaniose est un insecte nommé « phlébotome » (*figure.4.2*). Le parasite injecté au moment de la piqûre va parasiter le système réticulo-endothélial.

Le système réticulo-endothélial est en partie constitué des :

---

2. Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL)

## 4.2 Les cellules immunitaires impliquée dans la leishmaniose

---



FIGURE 4.2 – Image d'un phlébotome.

- Macrophages
- Cellules réticulaires
- Cellules endothéliales cellules littorales

### 4.2.1 Contamination chez l'homme

Le parasite a besoin de deux hôtes, le phlébotome et un mammifère, pour évoluer. Il est sous forme promastigote quand le phlébotome le transmet à l'homme. Il a alors une forme allongée et est doté d'un flagelle qui lui permet de se mouvoir. Une fois le parasite injecté dans le corps humain, un macrophage va le reconnaître comme étant étranger et va le phagocyter. C'est alors que le parasite va prendre le contrôle du macrophage et va évoluer en amastigote. Le parasite est alors moins allongé et son flagelle est beaucoup plus court, il perd donc sa faculté à migrer. Il se met alors à se reproduire par fission binaire (doublement de la population à chaque fission). Le macrophage est ensuite lysé, et sa membrane est désintégrée par le parasite. Les « déchets » résultants de cette lyse (les parasites multipliés) vont alors être phagocytés à nouveau, et les macrophages détruits de la même manière (*figure.4.3*).

### 4.2.2 Les macrophages

Un macrophage est un globule blanc qui dérive des monocytes. Quand une inflammation se déclenche dans une zone donnée, les monocytes qui circulent dans le sang vont s'y agglomérer et vont se différencier en macrophages pour combattre l'inflammation et réparer les tissus endommagés. Plus de détails en annexe (Cf annexe..6).

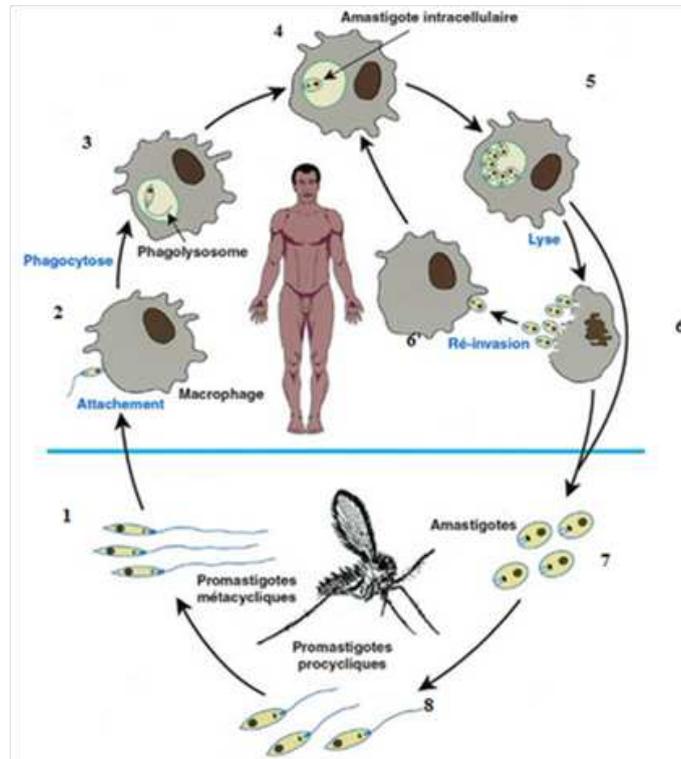


FIGURE 4.3 – Cycle de vie du parasite de la leishmaniose. *source (Handman, 2001)*

#### 4.2.2.1 Migration

Pendant longtemps l'étude de la migration des macrophages s'est faite dans des environnements 2D où les macrophages se déplaçaient sur une surface. L'enjeu est de considérer des environnements 3D pour respecter les conditions physiologiques. Il a été montré, notamment sur des cellules tumorales, que des cellules avaient un comportement très différent sur une surface ou dans un environnement 3D (Zaman et al., 2006).

# Chapitre 5

## Matériels et Méthodes micro-fluidique

### 5.1 Matériels

#### 5.1.1 Matériels chimiques

Pour la fabrication des dispositifs microfluidiques, nous utilisons des wafer de silicium 4 pouces (SPS-Europe), de la résine photosensible négative SU8 2150 (Microchem, Newton, MA, USA) et du PolyDiMéthylSiloxane (PDMS ; Elastomère silicone Sylgard 184, Neyco). Nous utilisons aussi le développeur SU-8 (MicroChem, USA) pour le développement de la résine, et le silane/siloxane pour rendre la surface du wafer hydrophobe. De l'éthanol, de l'isopropanol et de l'agent de nettoyage et de décontamination radioactif Decon90 (Decon, Angleterre) sont aussi utilisés lors de la fabrication.

#### 5.1.2 Matériels biologiques

Du collagène de rat type I (BD Biosciences) a été utilisé pour mimer la matrice. Le fMLP, CCL19 et CCL21 (R&D Systems) ont été utilisés comme chimio-attractant. Le milieu culture RPMI 1640 (Dutscher) supplémenté en sérum de veau foetal 10% (SVF) et en pénicilline/streptomycine est utilisé pour la culture des cellules.

#### 5.1.3 Instruments

Les appareils utilisés pendant de la fabrication des microdispositifs sont : le Plasma Cleaner (Harrick Plasma, USA), le spin coater Spin150i (SpinCoating, SPS-Europe), une plaque chauffante électrique de précision (EMS, Angleterre), un aligneur de masque CANON PLA-501 (CAE, USA), une pompe à vide, des sonicateurs, un four.

##### 5.1.3.1 Microscopie

La microscopie optique à transmission et la microscopie à contraste de phase ont été réalisées sur un microscope inversé Nikon Eclipse Ti équipé d'un Z motorisé (mouvement haut/bas) et de 2 objectifs x10 et x20 (à l'air) contrôlé par le logiciel Nikon Control. Les observations ont été faites à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub> (dans une boîte faite maison) en utilisant des ventilateurs de chauffage (FLH 400, Pfannenber) contrôlés par un indicateur digital (Di eco, Jumo) et une

## 5.2 Méthodes

---

pompe à air (OkoLab, Italie) équipée d'une bouteille de CO<sub>2</sub>. La caméra utilisée pour l'acquisition est une Andor sCMOS contrôlée par le logiciel Andor Solis et par Micro-Manager.

## 5.2 Méthodes

### 5.2.1 Système biologique

**Cellules dendritiques :** Les cellules dendritiques myéloïdes ont été purifiées par MACS (Miltenyi) selon la procédure décrite par (Pilette C et al. Allergy 2013). Elles ont été obtenues à partir de sang total prélevés chez des sujets témoins et des patients souffrant d'asthme allergique (au moins sensibilisés aux acariens). Le protocole a été accepté par notre Commission d'éthique local.

**Neutrophiles :** Les neutrophiles ont été purifiés par centrifugation sur gradient de densité au Dextran (Sigma-Aldrich), à partir de sang de sujet témoins et asthmatiques.

**Macrophages :** Les macrophages utilisés dans nos microsystemes sont extraits du péritoine de souris saines.

**Parasites** Les leishmanies sont cultivées dans du milieu de culture Schneider avec 10 % sérum et 1% d'antibiotique (Pénicilline/Streptomycine) et sont placées dans un incubateur à 24°C dans un laboratoire de niveau 2 à la plateforme de l'INSERM. (PPC209)(*figure.5.1*).

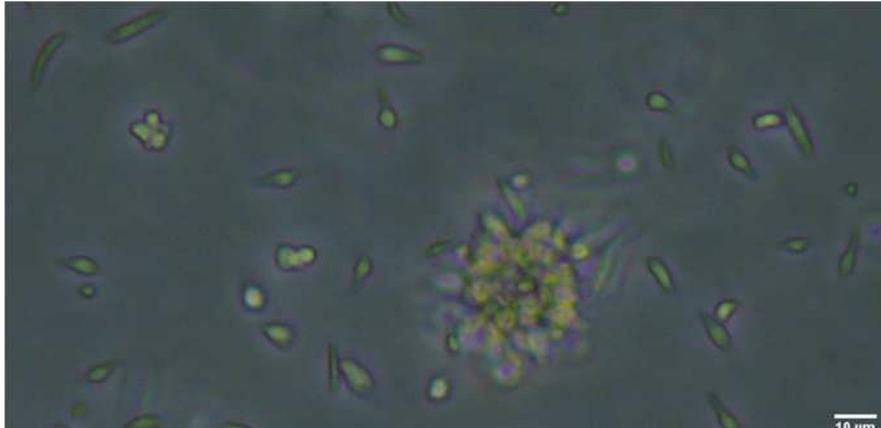


FIGURE 5.1 – Image des leishmanies en culture prise par *E.Desvignes*.

### 5.2.2 Fabrication du dispositif microfluidique

#### 5.2.2.1 La conception du masque

Nous avons dessiné plusieurs motifs avec différentes tailles à l'aide du logiciel CleWin (MESA+ Research) et nous les avons fait imprimer sur un masque de lithographie 5 pouces haute résolution à la Centrale de technologie MIMENTO.

#### 5.2.2.2 La photolithographie

Nous avons préparé le moule (wafer de silicium) par spin-coating (méthode d'étalement) d'une couche de 80  $\mu\text{m}$  de résine photosensible négative SU8 2150 sur le wafer suivi de la photolithographie dans la salle blanche Planète du CI-NaM.

Pour y procéder, nous lavons tout d'abord le moule dans un bécher contenant de l'acétone et nous le mettons à soniquer pendant 5 minutes puis de l'éthanol suivi aussi d'une sonication pendant 5 minutes. On rince ensuite avec de l'eau déionisée et on sèche avec un flux d'air. Le moule est mis sous vide dans un plasma à 150 °C pendant 10 minutes.

On dépose la résine sur le moule et on effectue un étalement (Coating) sous vide pendant 30 secondes à 500 rpm et une accélération de 100 puis de 30 secondes à 5000 rpm et une accélération de 300 avec le spin coater, suivi d'une cuisson douce pendant 5 minutes à 65 °C puis 20 minutes à 95 °C.

## 5.2 Méthodes

---

Cette fine couche de résine est ensuite illuminée aux UV (Canon PLA-501) à travers un masque représentant le motif (§.5.2.2.1) suivant d'une après-cuisson pendant 5 minutes à 65 °C puis 10 minutes à 95 °C. La résine réticule aux endroits éclairés et une étape de développement avec SU-8 développeur (2 minutes de près rinçage / 8 minutes rinçage) suivi d'un rinçage avec de l'isopropanol pour stopper le développement et enlever la partie non réticulée, laissant apparaître le motif en surface sur le wafer (résine négative).

On finit avec une dernière cuisson dure pendant 5 minutes à 150 °C avant la vérification du wafer et la mesure de son épaisseur.

### 5.2.2.3 Impression des motifs sur le polymère

Le moule doit être silanisé pour toute première utilisation. Dans une cloche à vide on met le wafer avec une goutte de silane/siloxane dans une coupelle de pesée et on laisse le tout à dégazer pendant 10 à 15 mn. En parallèle, la base et l'agent de réticulation du PDMS (§.5.1.1) sont mélangés soigneusement avec les proportions (10 :1 en masse), dégazé sous vide pendant 2 mn afin d'éliminer un maximum de bulles d'air, puis versés sur le moule et laissés à dégazer pendant une heure afin de supprimer les bulles d'air restantes. L'assemblage est ensuite durci dans un four à 65 °C pendant une heure minimum.

### 5.2.2.4 Nettoyage des lames de verre

On met des lames de verre (1 mm d'épaisseur) dans un support rempli de Decon90 à 5 % et on laisse soniquer pendant 30 minutes à 50 °. Ensuite, on rince plusieurs fois avec de l'eau, éthanol, puis eau et on sèche avec de l'azote.

### 5.2.2.5 Collage par plasma

Après refroidissement, le PDMS est légèrement décollé du moule et découpé à la taille des motifs. Les trous sont percés dans le PDMS avec un poinçon de trou de 0.75 mm de diamètre pour former des réservoirs d'entrée et de sortie. Le morceau de PDMS découpé est ensuite collé à une lame de verre de façon irréversible après un traitement au plasma d'oxygène.

Pour ce faire, on introduit les lames de verre nettoyées dans le Plasma Cleaner et on les laisse pendant 5 minutes au niveau (High) à une pression entre 400 et 800 mbar. Pendant ce temps là, on fait subir une épilation au morceau du PDMS découpé avec du scotch pour enlever toute saleté. Après les 5 minutes, on met les dispositifs en PDMS (sans le scotch) et les lames de verre prétraitées dans le plasma au niveau (Medium) pendant 1'30. A la fin, il suffira de sortir déposer les dispositifs en PDMS délicatement sur les lames de verre (sans appuyer) et un collage immédiat va s'établir. Afin de favoriser d'avantage le collage on met les dispositifs dans une étuve à 65 ° pendant 20 minutes minimum.

### 5.2.3 Migration 3D et formation du gradient linéaire

#### 5.2.3.1 Injection de la matrice

Le dispositif microfluidique est constitué de deux canaux parallèles reliés à une chambre centrale de culture des cellules (*figure.5.2*). Chaque canal latéral a une hauteur de 80  $\mu\text{m}$ , une largeur de 350  $\mu\text{m}$  et 3,5 mm de longueur. La chambre de culture cellulaire est de 80  $\mu\text{m}$  de hauteur, 100-300  $\mu\text{m}$  de largeur et 250 $\mu\text{m}$  - 1 mm de longueur. Pour éviter le débordement de la matrice contenant les cellules dans les canaux de perfusion latéraux lors de l'injection, nous avons conçu deux petits canaux étroits, qui sont tous les deux à 50  $\mu\text{m}$  de large et 30  $\mu\text{m}$  de longueur, reliant la chambre centrale de culture cellulaire avec les deux canaux latéraux.

On injecte le mélange matrice-cellules dans les entrées de la chambre centrale afin de la remplir. Le mélange généralement s'arrête à la jonction entre les canaux étroits et des canaux de perfusion latéraux en raison de la force capillaire (*figure.5.2*). Si le mélange déborde, on effectue une aspiration douce avant la polymérisation de la matrice ce qui pourrait enlever le gel dans les canaux de perfusion latéraux sans perturber le mélange dans la chambre centrale. Pour fournir une perfusion continue des solutions, on a connecté l'entrée des deux canaux latéraux avec un pousse seringue à double réservoir (Harvard Apparatus) contenant les solutions à injecter (milieux de cultures et sécrétions) et on a fournit un débit de 0,5 ml / heure.

## 5.2 Méthodes

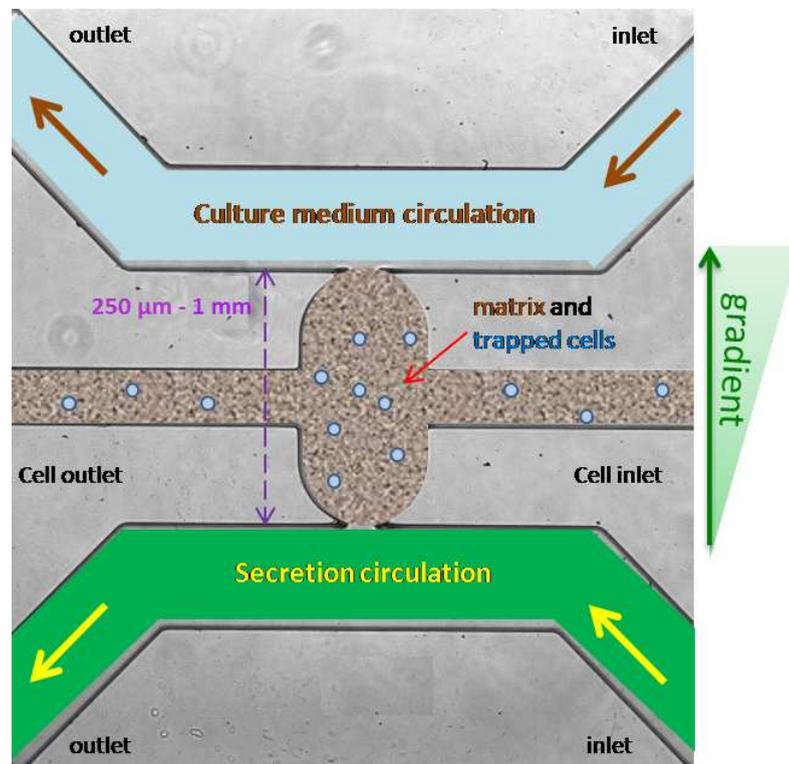


FIGURE 5.2 – Conception de la puce microfluidique pour l'étude de l'activation des cellules immunitaires dans un environnement 3D. Représentation schématique du dispositif. Deux canaux de perfusion parallèles pour introduire un chimio-attractant et une solution de contrôle, respectivement. Le mélange cellules-matrice extracellulaire est introduit au centre dans la micro-chambre.

### 5.2.3.2 Un gradient de concentration stable

Un gradient de concentration stable de substance attractive a été généré à travers la chambre de culture cellulaire, dans le temps (*figure.5.2*). Avant l'essai, nous avons utilisé un colorant (bleu de trypan) pour caractériser la génération gradient. La concentration du produit chimique dans la chambre de culture cellulaire peut être décrite par une équation de diffusion-1D. Le temps "t" requis pour permettre au gradient chimique d'atteindre un état d'équilibre peut être calculé à partir de la relation d'Einstein-Smoluchowski :  $t = L^2/2D$ , où L est la distance entre deux canaux de perfusion, et D est le coefficient de diffusion des molécules chimiques.

Expérimentalement, un dégradé linéaire a été établi à l'état d'équilibre après une heure, ce qui est en accord avec les prédictions théoriques. L'identité de gradients de concentration à deux chambres de culture cellulaire a été reconnue. Après avoir atteint l'état d'équilibre, le gradient est resté stable tant que la perfusion continue est maintenue. Un gradient stable est essentiel pour l'étude de la migration à cause de la vitesse de déplacement lente des cellules dendritiques par rapport aux neutrophiles. Le temps de maintien d'un gradient de concentration dans notre étude est suffisamment long pour étudier la migration de ces cellules.

### 5.2.4 Microsystème commercial

Le deuxième système utilisé pour l'étude de la migration 3D des macrophages sous un gradient de parasite est commercial. C'est un microsystème «  $\mu$ -Slide chemotaxis3D » commercialisé par la compagnie Ibidi. Les  $\mu$ -Slide chemotaxis3D sont composées de trois microsystèmes (*figure.5.3*). Chaque microsystème est composé de trois chambres. La chambre du centre fait 70  $\mu$ m de hauteur et 1 mm de largeur, elle peut contenir 8  $\mu$ l de matrice.

Les chambres latérales servent de réservoir et peuvent contenir 65  $\mu$ l de milieu permettant de maintenir un gradient stable pendant 24 heures. La matrice de collagène contenant les macrophages est placée dans la chambre centrale. D'un côté, est injectée une matrice de collagène et les leishmanies. De l'autre côté, on

## 5.2 Méthodes

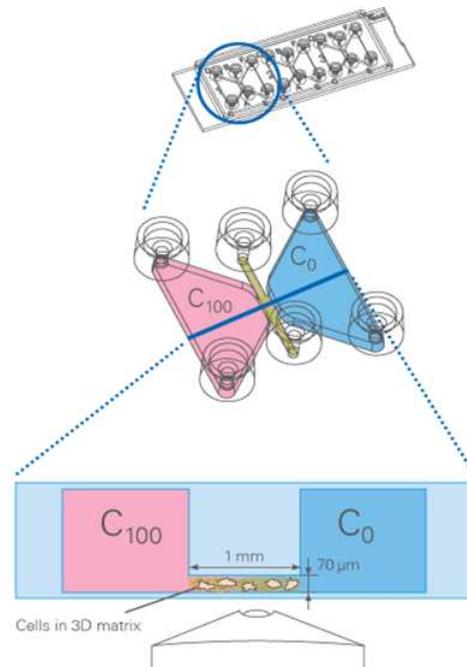


FIGURE 5.3 – Illustration des  $\mu$  – *slideChemotaxis*<sup>3D</sup>.

place un milieu de culture avec du sérum. Il s'établit donc un gradient de molécules ou de parasites de part et d'autre de la chambre centrale (*figure.5.3*).

### 5.2.5 Observation microscopique

La migration des cellules à l'intérieur des dispositifs a été observée en transmission et en contraste de phase avec les objectifs x10 et 20 à air (§.5.1.3.1) pendant une durée allant de 3 heures jusqu'à 48 heures avec une fréquence d'acquisition qui varie de 2 images par minute à 1 image toutes les 2 minutes.

### 5.2.6 Analyse d'image

Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel Fiji (open source). Un pré-traitement des images a été effectué en soustrayant le fond (background). L'outil Trackmate de Fiji est ensuite utilisé pour suivre les déplacements des cellules dans le temps et établir leur trajectoire (*figure.5.4*). L'analyse des données de trajectoire a été effectuée par Chemotaxis.

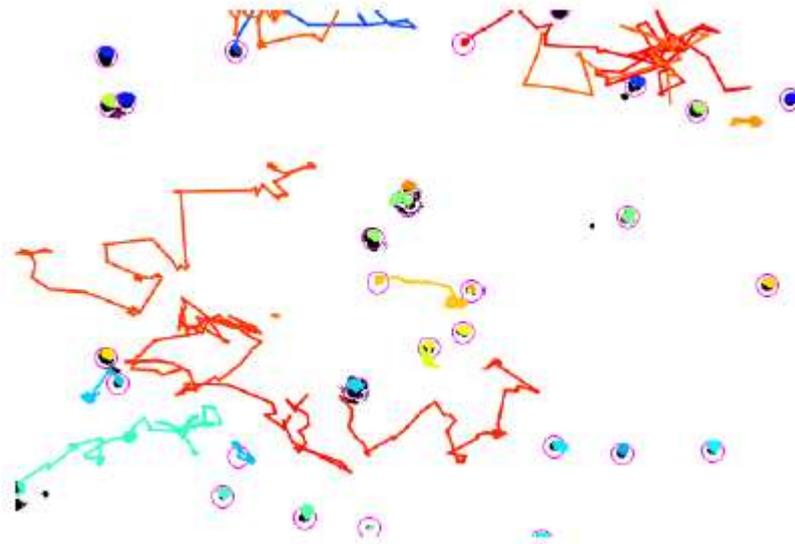


FIGURE 5.4 – Exemple des trajectoires établies par TrackMate après l'analyse et le suivi des cellules.

# Chapitre 6

## Résultats

## Objectif

Le premier challenge de cette étude est la conception de la puce microfluidique pour l'étude de l'activation des cellules immunitaires dans un environnement 3D, en se basant sur un modèle de dispositif microfluidique publié dans (Liu et al., 2009). Nous avons dessiné dans un premier temps le dispositif et avons essayé de le rendre opérationnel. Dans ce dispositif, les cellules sont piégées dans une matrice à l'intérieur d'une chambre centrale en contact avec un canal de commande latéral, fournissant un milieu de culture, et un autre canal latéral, contenant les sécrétions produites par l'épithélium du patient ou des sur-nageants de cultures primaires (*figure.5.2*). Un gradient de sécrétions est établi dans le canal central par diffusion. Le test vise à fournir un paramètre facile à mesurer : la distance parcourue par la cellule en un temps donné en présence de sécrétions produites par l'épithélium du patient (ou chimiokines). Cette distance sera la puissance inflammatoire des sécrétions et dépendra aussi de la structure de l'environnement dans lequel les cellules sont piégées. Un étalonnage de l'essai est proposé en utilisant des chimio-attractants commerciaux typiques de l'inflammation.

## 6.1 Dispositif microfluidique

### 6.1.1 Viabilité des cellules

Une fois le microdispositif conçu, nous avons testé la viabilité des cellules piégées dans la matrice extracellulaire en suivant l'évolution de leur comportement sur une plage allant de 6 heures jusqu'à 24 heures en fonction du type cellulaire utilisé. Les cellules vivantes lors de l'incubation dans le microsystème restaient en mouvement pendant toute la durée l'observation ce qui ne nécessitait pas l'utilisation de marqueurs de viabilité spécifiques.

## 6.1 Dispositif microfluidique

---

### 6.1.2 Matrice extracellulaire

Nous avons utilisé une matrice extracellulaire constituée de collagène de rat de type I (acheté chez BD Bioscience) à une concentration finale de 1,6-1,8 mg/ml. Nous avons choisi cette matrice avec cette concentration, après différents tests avec d'autres matrices (matrigel et mélange collagène-matrigel) à des concentrations variables. Le choix de la matrice et de la concentration a été consolidé par la facilité du mouvement des cellules immunitaires tout en essayant de mimer la matrice extracellulaire. Le matrigel seul est très rigide et empêchait le déplacement des cellules qui sont piégées. Nous avons déterminé le temps nécessaire à la polymérisation de la matrice de collagène. Ce temps varie entre 20 et 40 minutes en fonction de la concentration utilisée. Nous avons déterminé la concentration de cellules permettant d'avoir un nombre suffisant dans la chambre centrale pour le suivi de la migration. Cette concentration est de  $10^5 - 10^6$  cellules / ml.

### 6.1.3 Une perfusion continue

Comme nous l'avons déjà décrit (§5.2.3.1), le dispositif microfluidique est constitué de deux canaux parallèles reliés à une chambre centrale de culture des cellules (*figure.5.2*).

Nous injectons le mélange matrice-cellules dans les entrées de la chambre centrale et les solutions du milieu de culture et des substances chimio-attractantes dans les canaux latéraux (*figure.6.1*). Pour fournir une perfusion continue des solutions, nous avons connecté l'entrée des deux canaux latéraux avec un pousse seringue à double réservoir contenant les solutions à injecter (milieux de cultures et substances chimio-attractantes) et nous avons fourni un débit de 0,5 ml / heure.

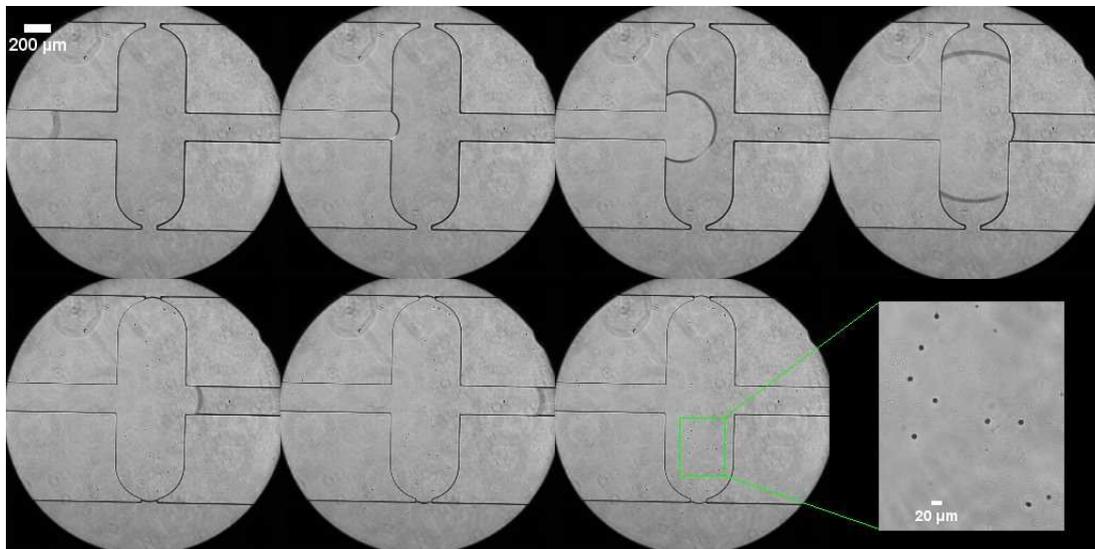


FIGURE 6.1 – Les étapes d’injection du mélange matrice-cellules dans la chambre centrale de culture avec un agrandissement montrant les cellules piégées dans la matrice.

## Test du dispositif microfluidique

### 6.1.4 Résultats Préliminaires

L’étude de la migration des cellules dendritiques humaines (DCs) et des neutrophiles sera utilisée pour valider le système et pourra servir dans le futur comme outil pour répondre aux questions de la relation entre le remodelage des voies aériennes (l’espace sous-épithélial, la stratification de l’épithélium) et l’activité spécifique de ces cellules immunitaires.

#### 6.1.4.1 Cellules dendritiques

Pour tester le rôle potentiel inflammatoire de l’épithélium dans l’asthme, nous avons utilisé les ligands de CCR7, c’est-à-dire CCL19 et CCL21, en contact avec les DCs confinées dans un environnement (collagène) qui imite la membrane basale sous-épithéliale. Nous avons utilisé les DCs issues directement du sang humain.

Nous avons réussi à piéger un nombre suffisant de DCs dans la matrice de

## 6.1 Dispositif microfluidique

---

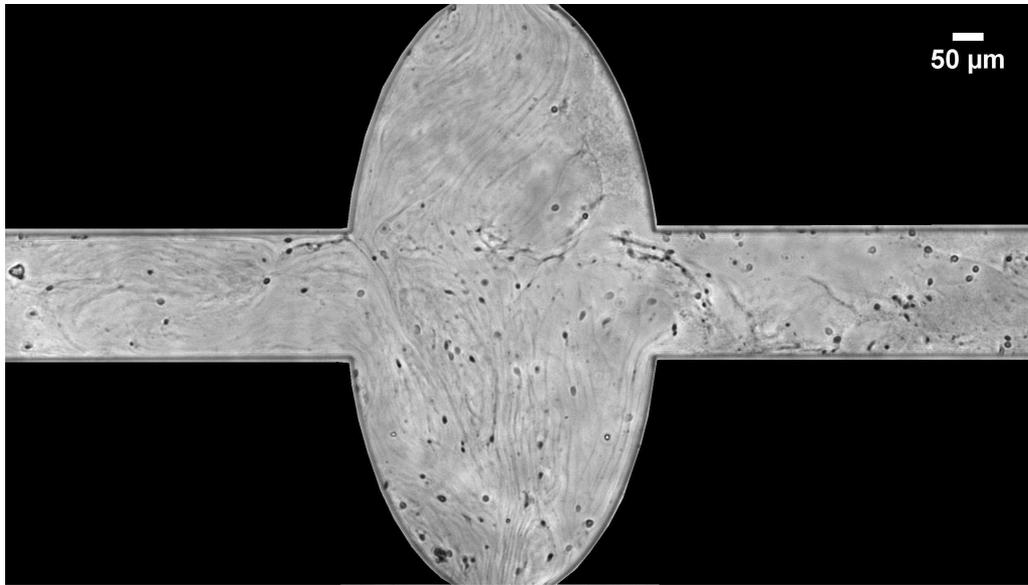


FIGURE 6.2 – Les cellules dendritiques piégées à l'intérieure de la matrice de collagène après polymérisation de cette dernière.

collagène à l'intérieur de la chambre centrale du système microfluidique (*figure.6.2*). Après la polymérisation de la matrice, nous avons établi un gradient de chimio-attractants en faisant passer du milieu de culture RPMI dans un canal latéral et des chimiokines (CCL19 et CCL21) diluées dans du milieu de culture dans l'autre canal.

Nous avons testé plusieurs conditions. Dans un premier temps, nous avons utilisé des concentrations de CCL19 de 50 ng / ml et CCL21 de 100 ng / ml en mettant les deux chimiokines séparément puis ensemble dans le canal latéral. Nous n'avons observé aucune migration dirigée des DCs bien que ces dernières soient vivantes. Nous avons fait varier les concentrations jusqu'à observer une migration des cellules dendritiques (*figure.6.3*). Nous avons constaté une migration des DCs à une concentration de 1.25 µg / ml de CCL19.

Nous avons représenté la migration de 100 cellules dendritiques dans un graphique polaire (*figure.6.4*). Étant donné que le chimio-attractant est placé dans le canal latéral de gauche par rapport à la chambre centrale qui contient les cellules, nous pouvons observer une tendance de déplacement des DCs vers la gauche sur le graphique polaire. Cette migration des cellules dendritiques est

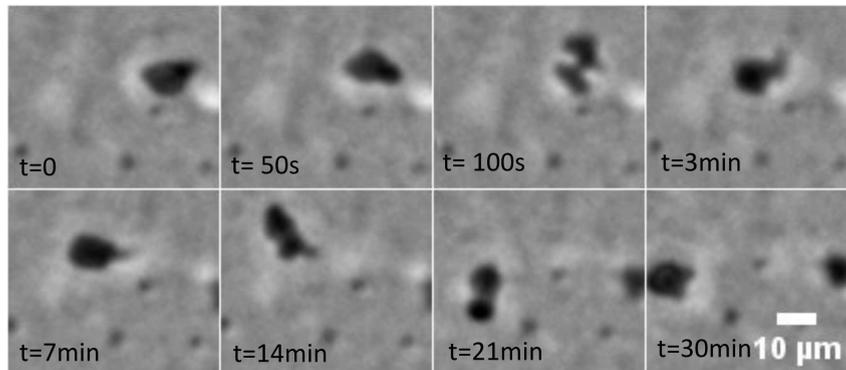


FIGURE 6.3 – Séquences de la migration d’une cellule dendritique à différents intervalles de temps.

Tableau 6.1 – Tableau des valeurs de la migration des cellules dendritiques.

	Min	Max	Mean	SD
Velocity ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	0	10.7	1.96	2.17
Center of mass ( $\mu\text{m}$ )	X=-4.95		Y=-1.21	

en moyenne de  $\sim 5\mu\text{m}$  vers le chimio-attractant (côté gauche), avec une vitesse moyenne de  $\sim 2(0 - 10,7)\mu\text{m}/\text{min}$  (tableau.6.1).

#### 6.1.4.2 Les neutrophiles

Nous avons de la même façon piégé des neutrophiles à l’intérieur de la chambre centrale et nous les avons soumis à un gradient de chimio-attractant fMLP à une concentration de  $10^{-6}$  M (figure.6.5). Bien que la concentration de  $10^{-7}$  M soit rapportée dans la littérature, elle n’est assez suffisante dans notre système pour l’attraction des neutrophiles.

Nous avons représenté la migration des neutrophiles dans un graphique polaire (figure.6.6). Le chimio-attractant est placé dans le canal latéral de gauche par rapport à la chambre centrale qui contient les cellules. Nous pouvons observer un déplacement clair des neutrophiles dans la figure.6.6.A. Dans le graphique 6.6.B, nous avons plus de cellules et le déplacement vers le chimio-attractant est plus faible. Cette migration des neutrophiles est en moyenne de  $\sim 23\mu\text{m}$  (A) et  $\sim 2,5\mu\text{m}$  (B) vers le chimio-attractant (côté gauche), avec une vitesse moyenne de  $\sim 9,9(3,4 - 15,8)\mu\text{m}/\text{min}$  et  $\sim 5,8(0,1 - 21,5)\mu\text{m}/\text{min}$  pour A et B respecti-

## 6.1 Dispositif microfluidique

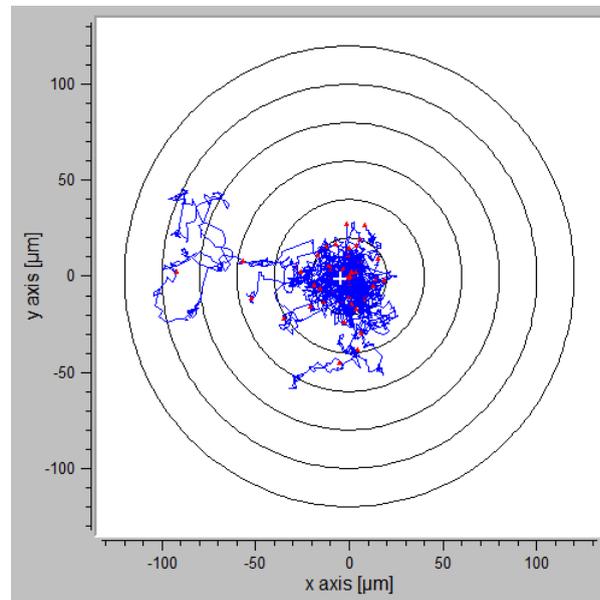


FIGURE 6.4 – Graphique polaire de la migration des cellules dendritiques (100 cellules).

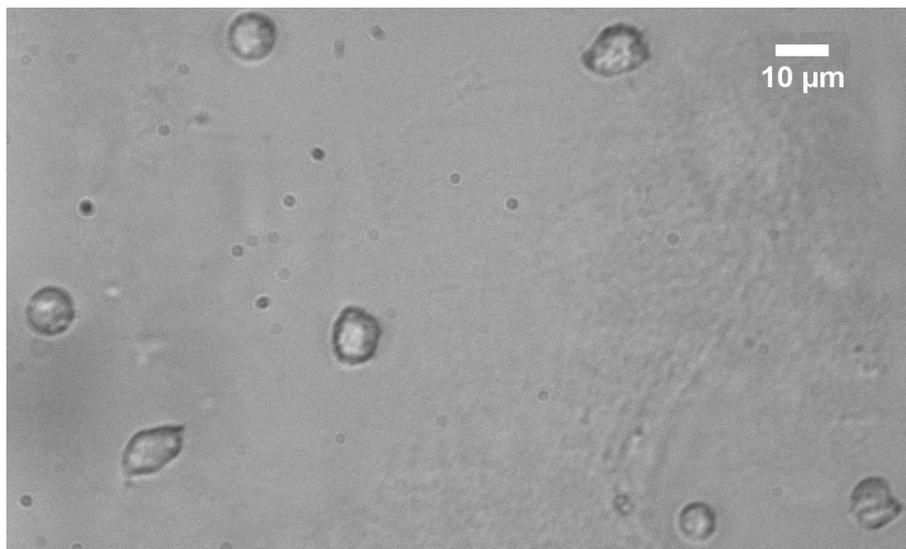


FIGURE 6.5 – Les neutrophiles piégés à l'intérieure de la matrice de collagène après polymérisation de cette dernière.

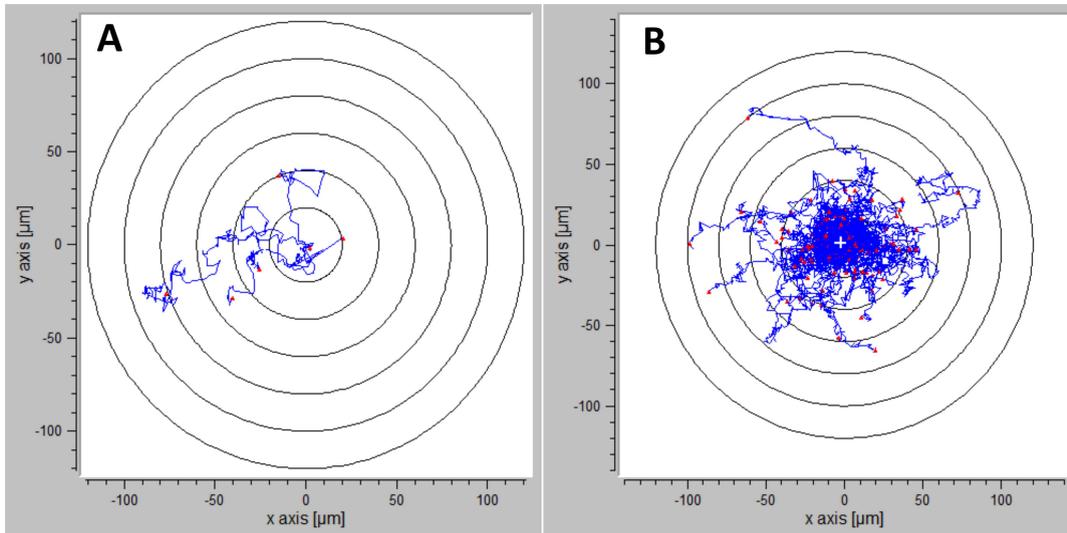


FIGURE 6.6 – Graphique polaire type de la migration des neutrophiles.

Tableau 6.2 – Tableau des valeurs de la migration des neutrophiles.

	Min	Max	Mean	SD
Velocity ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (A)	3.4	15.8	9.9	5.3
Center of mass (A) ( $\mu\text{m}$ )	X=-23		Y=-4.6	
Velocity (B) ( $\mu\text{m}/\text{min}$ )	0.1	21.5	5.8	3.9
Center of mass (B) ( $\mu\text{m}$ )	X=-2.5		Y=1.6	

vement (*tableau.6.2*).

Les neutrophiles du groupe A sont issus d'un sujet sain alors que ceux du groupe B provient d'un sujet fumeur. Les neutrophiles du fumeur sont pré-excités et donc sont moins sensible au gradient de chimio-attractant. Cette pré-excitation peut être à l'origine de la faible migration vers la direction du chimio-attractant dans le groupe B.

### 6.1.5 Conclusion

Ces résultats préliminaires s'avèrent encourageants pour la validation du système biomimétique. L'intérêt de ce système est la maitrise des différents paramètres permettant de modifier à la fois la taille du microdispositif et la compo-

## 6.2 Dispositif commercial

---

tion de la matrice pour s'adapter aux différents environnements étudiés. De plus, la perfusion continue des solutions dans les canaux latéraux est contrôlée et la solution peut être modifiée à tout moment pour tester les différentes molécules.

Nous avons observé une migration directionnelle des cellules dendritiques et des neutrophiles soumis à un gradient de chimio-attractant. Nous avons noté la sensibilité différente des neutrophiles issus de sujet sains et de sujet fumeur au gradient de substance attractive. Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur les résultats de la migration des cellules dendritiques et des neutrophiles en raison du faible nombre d'échantillon. Néanmoins, ces expériences préliminaires ont permis de s'ouvrir à des perspectives :

- Observer la migration des cellules en utilisant les surnageants de culture épithéliales d'asthmatiques.
- Sonder le degré d'attraction des différentes molécules composantes des surnageants de culture épithéliales séparément.
- Observer et comparer le comportement des cellules immunitaires issues de sujets sains et des cellules de patients soumises à un gradient de chimio-attractant.
- Modifier la composition de la matrice pour sonder le remodelage bronchique.

## 6.2 Dispositif commercial

En parallèle avec la précédente étude, j'ai co-encadré une stagiaire (Emma Desvignes) avec qui nous avons menés des expériences de la migration des macrophages et des neutrophiles soumis à un gradient de leishmanies dans des dispositifs commercial de la compagnie IBIDI.

### 6.2.1 Description des expériences

Deux expériences avec des gradients de leishmanies ont été réalisées (*figure.6.7*). Un mélange macrophages ( $10^6$  /ml) et matrice de collagène (1.8 mg/ml) a été injecté dans la chambre centrale du microsysteme. Le milieu de culture à 10% de sérum a été placée dans la chambre de droite et le mélange matrice de

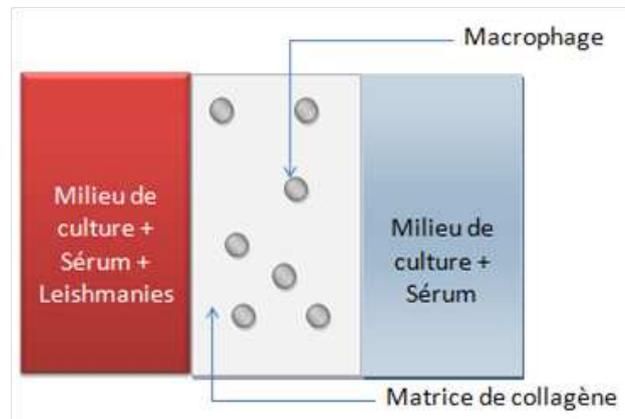


FIGURE 6.7 – Schéma des expériences avec leishmanies.

collagène (1.8 mg/ml) et leishmanies ( $10^6$  /ml) dans la chambre de gauche. Les chambres latérales ont une contenance de  $65 \mu\text{l}$  et servent de réservoirs. Dans ce système, les réservoirs sont fermés et il n’y a pas de perfusion continu. La migration des macrophages a été suivi sur 48 heures. En parallèle, des expériences contrôles sans gradient de leishmanies ont été réalisées dans les mêmes conditions avec un milieu de culture dans les deux chambres latérales.

### 6.2.2 Observation

Nous avons observé en temps réel la migration des macrophages dans le système IBIDI. Un exemple de la phagocytose d’une leishmanie par un macrophage dans un environnement 3D est représenté dans la figure.6.8. Le macrophage migre pendant 30 minutes (*figure.6.8.A*) avant de s’arrêter sur une leishmanie pendant 20 minutes (*figure.6.8.B*), puis le macrophage se remet à migrer, et la leishmanie a disparu (*figure.6.8.C*).

### 6.2.3 Analyse des trajectoires

Trois paramètres physiques sont analysés : le taux de migration, la vitesse instantanée moyenne et la directionnalité des cellules. La figure.6.9 montre typiquement le genre de graphe que l’on analyse.

## 6.2 Dispositif commercial

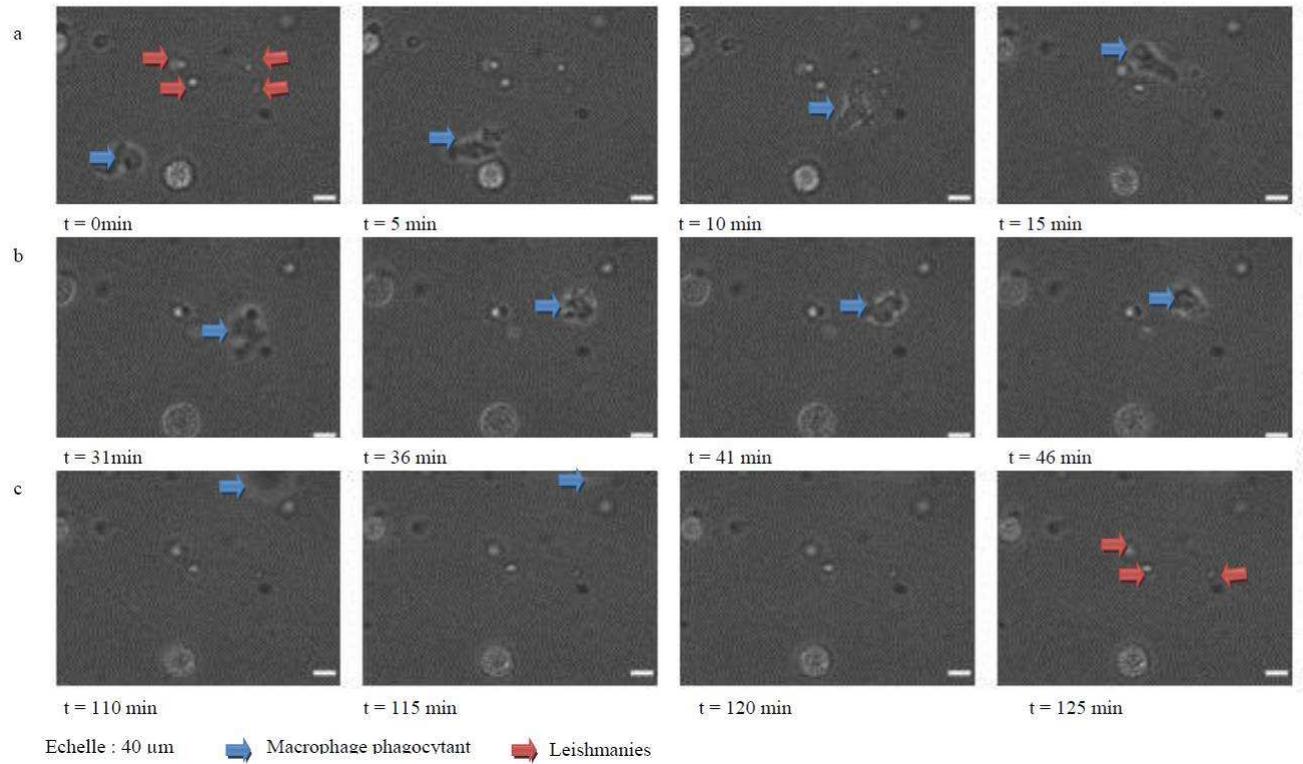


FIGURE 6.8 – Suivi en temps réel d'un macrophage phagocytant une leishmanie.

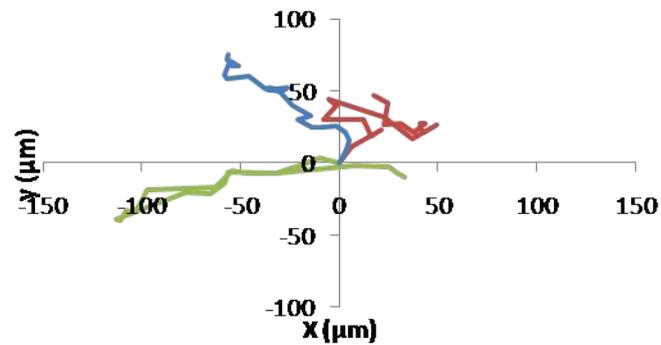


FIGURE 6.9 – Les trajectoire de 3 macrophages sur une période de 2 heures.

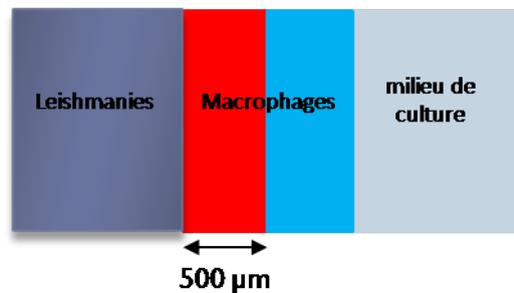


FIGURE 6.10 – Division de la chambre centrale IBIDI en deux parties pour l'analyse des résultats.

Le taux de migration est défini comme le nombre de macrophages identifiés comme migrant divisé par le nombre de macrophages identifié comme non migrant. Les macrophages non migrant sont les macrophages qui ne bougent pas tout le long du suivi de la migration.

La vitesse instantanée correspond à la vitesse entre deux positions consécutives du macrophage avec  $\Delta t = 4$  minutes. La vitesse instantanée moyenne est la moyenne de toutes les vitesses instantanées d'un seul macrophage pendant un temps donné.

La directionnalité des macrophages est évaluée grâce à leur coordonnées x et y au cours du temps.

La chambre centrale contenant le mélange matrice / macrophages a une largeur de 1 mm. Les expériences avec les gradients de leishmanies ont été traitées pour distinguer les macrophages près des leishmanies ( $\leq 500 \mu\text{m}$ ) des macrophages loin des leishmanies ( $> 500 \mu\text{m}$ ) (figure.6.10). Tout au long des résultats le code couleur suivant sera appliqué :

- Macrophages proches des leishmanies : Rouge.
- Macrophages loin des leishmanies : Bleu.
- Macrophages des expériences témoins : noir.

## 6.2 Dispositif commercial

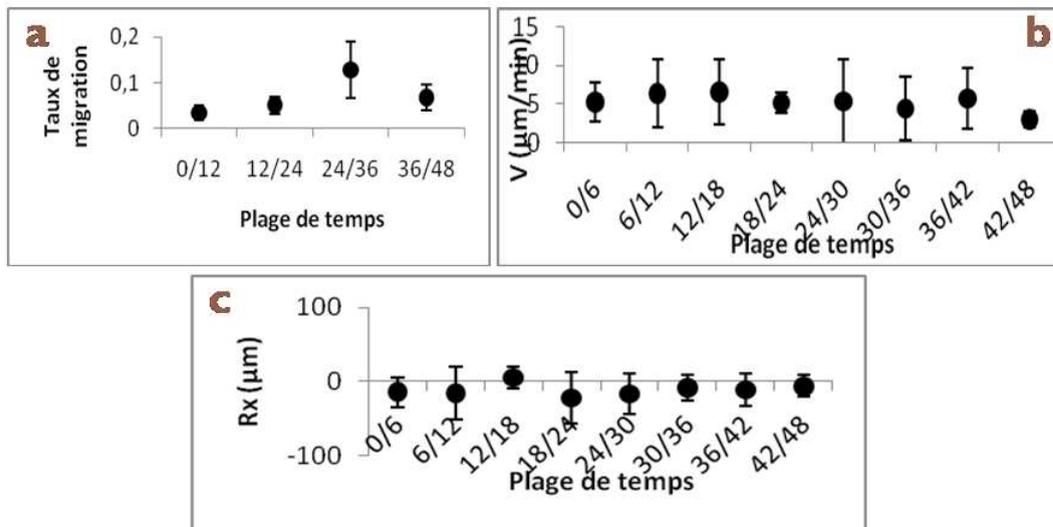


FIGURE 6.11 – Analyse de la migration des macrophages témoins. (a) Taux de migration (b) vitesse instantanée et (c) la direction de migration.

### 6.2.4 Résultats préliminaires

Nous avons observé une migration des macrophages témoins et des macrophages sous influences d'un gradient de leishmanies. Chez les témoins le taux de migration et la vitesse instantanée sont constants sur 48 heures. Quant à la direction de migration, elle est aléatoire sur toute la plage de temps (*figure.6.11*). Le taux moyen de migration des macrophages témoins sur 48 heures dans une matrice de collagène de type 1 est de  $0.071 \pm 0.040$ . La vitesse instantanée de migration dans notre système 3D est de  $5.91 \pm 0.90 \mu\text{m}/\text{min}$ . Cette vitesse est plus grande que celle rapportée sur un système 2D  $0.7 \mu\text{m}/\text{min}$  (Grabher et al., 2007).

Les macrophages soumis à un gradient de leishmanies présentent deux comportements différents :

- Les macrophages proches des leishmanies migrent à l'opposé de ces dernières. De plus, leur vitesse de migration diminue significativement après 18 heures. Quant au taux de migration, il est plus élevé que les témoins puis diminue après 18 heures (*figure.6.12*).
- A l'inverse les macrophages loin des leishmanies présente un comportement similaire aux témoins. La vitesse de migration est stable avec le temps et la direction de migration est aléatoire. Cependant, le taux de mi-

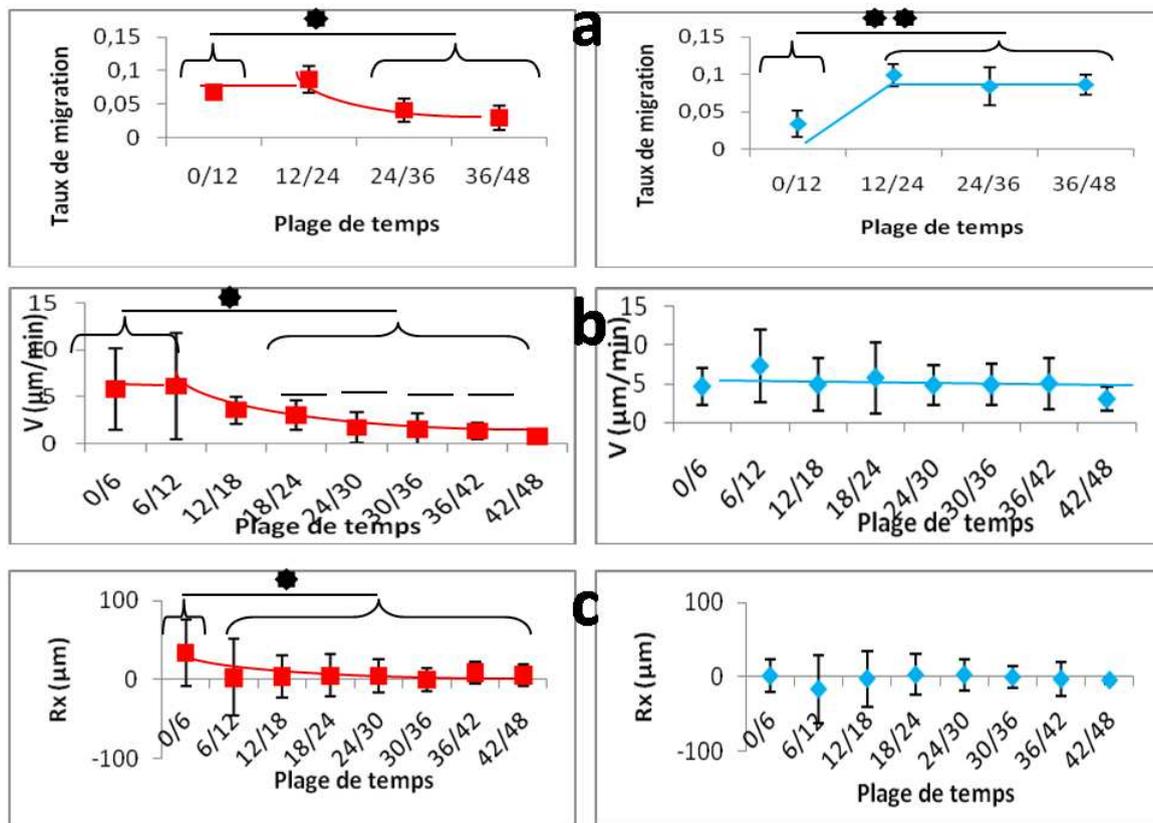


FIGURE 6.12 – Analyse de la migration des macrophages soumis à un gradient de leishmanies. (a) Taux de migration (b) vitesse instantanée et (c) la direction de migration. Les courbes rouges correspondent à la migration des macrophages près des leishmanies et bleues loin des leishmanies.

gration augmente de façon significative pendant les 24 premières heures et se stabilise ensuite (figure.6.12).

Ces résultats laissent suggérer que, les macrophages proche des leishmanies sentent la présence de ces dernières et donc les fuient en migrant dans la direction opposée. Ce qui peut expliquer le taux élevé de migration pendant les 12 premières heures. Les leishmanies mettent du temps pour rentrer dans la matrice de collagène (66  $\mu\text{m}$  en 6 heures (Petropolis et al., 2014)), mais après 18 heures les macrophages se font rattraper et infecter par les leishmanies. Les macrophages infectés s’immobilisent et il en résulte une diminution du taux et de la vitesse de migration. L’objectif principale de cette étude étant la validation du système, une discussion approfondie de l’influence des leishmanies est rapportée en annexe (Cf annexe.8).

### 6.2.5 Conclusion

Notre objectif principal de validation du système biomimétique est un succès, puisqu'il nous a permis de suivre la migration 3D des macrophages sous l'influence des parasites. On a trouvé de manière surprenante que les macrophages fuient les parasites sous l'effet d'une expression moléculaire non élucidée. Après un certain temps, les parasites rejoignent les macrophages et les infectent. Une fois les macrophages infectés, leur vitesse de migration diminue et deviennent moins mobiles.

### 6.2.6 Perspectives

Dans un premier temps il serait intéressant de refaire les expériences pour augmenter le nombre de données statistiques et conforter la validation du système. Dans un deuxième temps il faudrait réaliser des expériences similaires en remplaçant les leishmanies par des molécules de l'inflammation et voir si elles affectent la migration des macrophages.

Pour finir, ces mêmes expériences ont été réalisées avec des neutrophiles pour voir si le comportement des macrophages que nous avons observé s'applique à tous les types de phagocytes. Les résultats sont présentés en annexe (cf. annexe.9) et ne sont pas discutés.



# Conclusion Générale



# Conclusion Générale

L'épithélium des voies respiratoires constitue une barrière physique qui protège le poumon contre les corps étrangers contenus dans l'air, par le biais de la fonction de l'escalator mucociliaire. Il joue également un rôle métabolique et immunitaire important par la production de certaines cytokines et chimiokines particulières. L'atteinte de l'épithélium est une des caractéristiques physiopathologiques de l'asthme et la BPCO.

De nombreuses approches biologiques et médicales sont utilisées pour étudier l'épithélium bronchique sur des modèles d'études parfois très loin des conditions physiologiques. Dans notre travail, nous disposons de deux atouts importants : l'approche de cette étude par la physique et le modèle d'épithélium reconstitué *in vitro* à partir de biopsies humaines.

Nous avons montré, dans la première partie, que les modèles d'épithélium reconstitués ALI permettent le transport de la couche de surface (mucus visco-élastique) et de fluide Newtonien à l'échelle macroscopique de l'ensemble de la chambre de culture. L'écoulement a la symétrie circulaire de la chambre et est caractérisé par une vitesse angulaire constante. Ces résultats suggèrent une forte organisation spatiale des forces de poussée exercées par les cils battants.

Nous avons montré que, même en absence de transport de mucus, les touffes ciliaires exercent des forces générant des écoulements de fluide Newtonien permettant un transport sur des domaines quasi-circulaires localisés et indépendants les uns de autres, à vitesse angulaire constante. Nous avons montré que la distance, sur laquelle le mucus ou un fluide Newtonien pouvaient être transportés, dépendait directement du taux de couverture de l'épithélium par les touffes ciliaires actives, et qu'une loi d'échelle, valable sur près de 4 ordres de grandeur

corrèle la taille de ces domaines de transport au taux de surface recouverte par les touffes ciliaires actives. La courbe s'applique de l'échelle de quelques touffes ciliaires à l'échelle de la trachée. Les données physiologiques et les données sur épithéliums reconstitués se placent sur une même courbe maitresse.

Nous avons relevé que le degré d'orientation des cils est aussi important pour un transport macroscopique à vitesse angulaire constante et que la présence du mucus viscoélastique est nécessaire pour coordonner cette orientation. Cela suggère que les contraintes mécaniques imposées par l'écoulement sur l'épithélium jouent un rôle majeur, non seulement pour imposer la direction de battement ciliaire mais aussi pour réguler la densité locale en cellules ciliées et son organisation spatiale. En particulier, il y a peu de cellules ciliées au centre de l'écoulement. Un phénomène de mécanotransduction est suspecté et reste à explorer. Nous avons montré que la fréquence de battement des cils ne joue pas sur l'établissement du transport mais influence la vitesse de la clairance.

Enfin, nous avons montré que la concentration du mucus et ses propriétés rhéologiques ne semblent pas altérées dans l'asthme sévère et la BPCO dans nos cultures et que l'anomalie de la clairance mucociliaire chez ces patients serait due au manque drastique de touffes de cils actives.

Dans la deuxième partie, nous avons mis au point un système bio-mimétique permettant d'étudier la migration cellulaire par chimiotaxie. Nous avons pu valider deux systèmes et observer la migration de trois types de cellules différentes. Ces résultats préliminaires étant prometteurs, de plus amples investigations seront à réaliser afin de tester différents stimuli. Ce système pourra notamment être utilisé pour tester le rôle potentiel de l'épithélium sur les cellules de l'inflammation dans l'asthme sévère.

# ANNEXES

## .1 Fréquences en solution

Comme pour les contrôles, nous avons aussi regardé la fréquence médiane des battements de cils lorsque les cellules ciliées sont immergées dans une solution pour les asthmatiques sévères (3 sujets) (*figure.13*). Cette dernière est significativement plus faible en immersion : [contrôle 15,37 Hz - asthme sévère 12,03 Hz] comparé aux fréquences mesurées pour les mêmes sujets à l'interface air/liquide et après l'élimination de la couche de mucus [contrôle 18,21 Hz et asthme sévère 14,87 Hz] (\* P < 0,0001). De plus, la différence de la fréquence médiane de battement des cils entre les contrôles (15,37 Hz) et les asthmatiques sévères (12,03) est importante en immersion, et diminue significativement entre les deux groupes (\* P < 0,037)

## .2 Chambre de culture Epithelix

Nous avons aussi mesuré l'activité ciliaire dans les puits des cultures en provenance d'Epithelix (R = 3 mm). Ces cultures vont nous servir de modèle d'approche physiologique. En effet, nous avons relevé une fréquence médiane de battement des cils de  $12,1 \pm 1,6$  Hz et un pourcentage moyen de touffes de cils actives de 60% [56%-71%], soit la gamme des mesures physiologiques rapportées dans la littérature pour les voies aériennes humaines.

## .3 L'effet attractif du domaine circulaire

Certains domaines circulaires présente un effet d'attraction. Nous avons enlevé le mucus et mis une solution de billes et suivi l'évolution du domaine sur 24h. Le domaine circulaire double de taille après un jour, il passe de 1 mm à 2 mm de diamètre (*figure.14*).

### .3 L'effet attractif du domaine circulaire

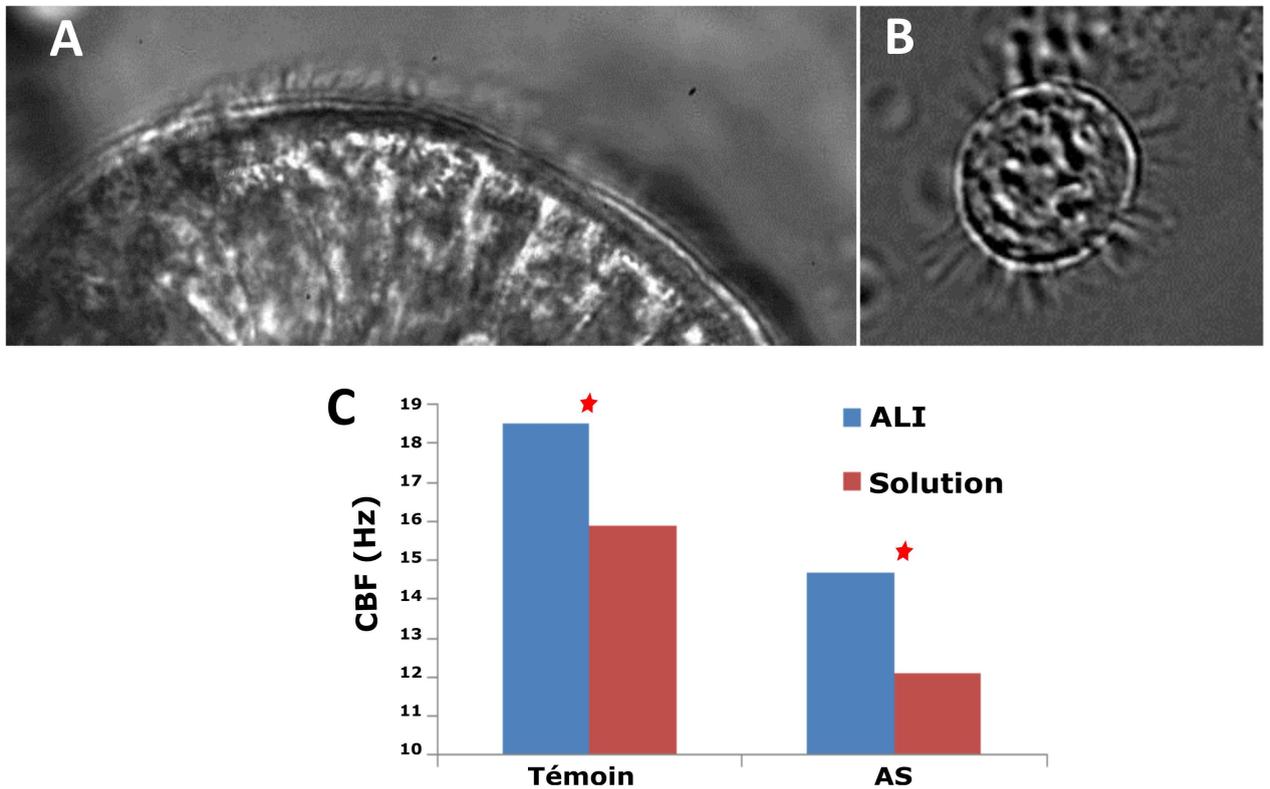


FIGURE 13 – Vues latérales de touffes de cils en immersion dans le milieu de culture obtenues par microscopie à transmission pour (A) une coupe de l'épithélium d'une dizaine de cellules ciliées colonnaires sont visibles et (B) une cellule individuelle. (C) Fréquence des battements ciliaires à l'interface air-liquide des cultures épithéliales (bleu) et en immersion dans un milieu de culture (rouge) des sujets sains et asthmatiques sévères (SA). Les résultats sont exprimés sous forme de médianes et inter-quartiles avec 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles. Le groupe (contrôle vs SA) \*  $P < 0,036$  et la mesure (ALI vs immersion) \*  $P < 0,0001$ . Test Kruskal-Wallis suivi par test post hoc.

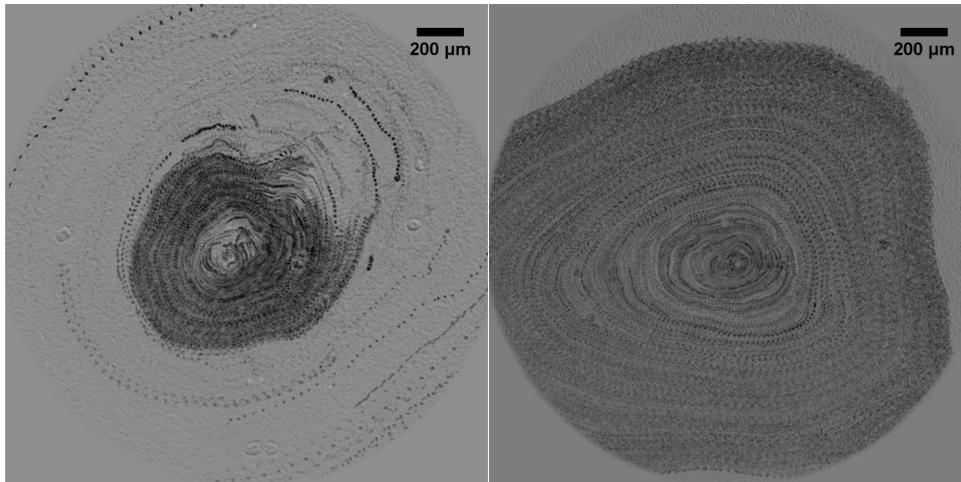


FIGURE 14 – Superposition d’une pile d’images montrant l’évolution de la taille du domaine de 1 mm (à gauche) à 2 mm après 24h (à droite). La durée d’acquisition est de 100 sec pour les deux images. (les billes apparaissent en noir)

#### .4 Lésion dans la surface épithéliale

Il faut noter que ces domaines circulaires ne sont pas altérés par la présence des lésions ou le manque des cils dans certain endroit. En effet, l’épithélium de notre modèle ne présente pas "un tapis dense" de cils qui sont en contact les uns avec les autres. Ces touffes de cils sont espacés et l’épithélium peut présenter des trous dans certains endroits (*figure.15*).

#### .5 Le modèle physique

Le modèle est développé en utilisant le modèle à trois couches introduit dans (Smith et al., 2007). On considère une structure à trois couches de la surface liquide des voies aériennes (ASL), comprenant une couche périciliaire inférieure de fluide newtonien (PCL), une couche sus-jacente de traction et une couche de mucus supérieure plus épaisse (*figure.16*). Dans ce modèle, la couche de traction est essentiellement une extension viscoélastique linéaire de la couche de mucus, qui définit l’étendue maximale à laquelle les pointes des cils s’étendent et où la couche de traction peut être considérée comme étant responsable de la transmission de forces des pointes de cils à la couche de mucus.

La longueur des cils est considérée comme étant d’environ  $6 \mu\text{m}$ , et la ma-

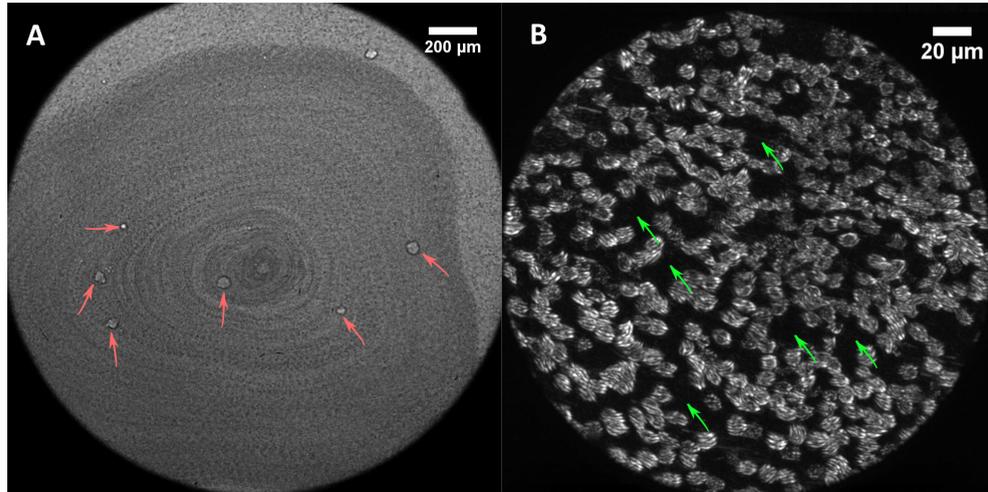


FIGURE 15 – (A) Présence de zones sans cellules ciliées actives ( $\uparrow$ ) sur l'épithélium sur un domaine circulaire. (B) L'espace entre les cils ( $\uparrow$ ) dans une chambre de culture où le mouvement circulaire est observé sur l'ensemble de la culture.

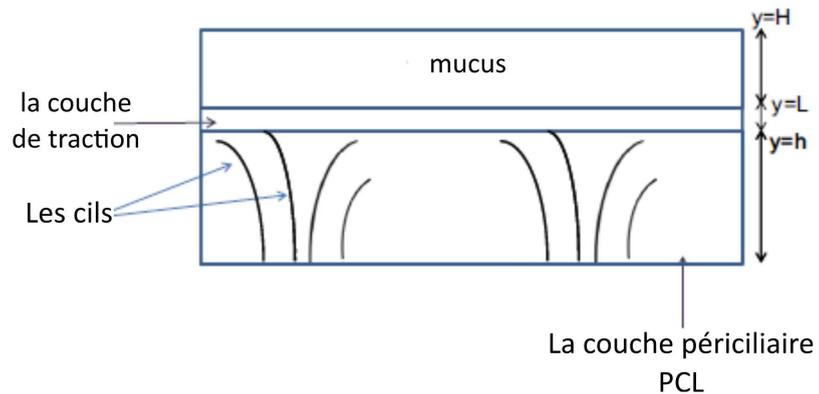


FIGURE 16 – La structure à trois couches de la surface liquide des voies aériennes (ASL), une couche périciliaire inférieure de fluide newtonien (PCL), une couche sus-jacente de traction et une couche de mucus supérieure plus épaisse. Le PCL est prise égale à  $5,4 \mu\text{m}$ , la couche de traction  $\sim 0,6 \mu\text{m}$  et couche de mucus  $\sim 4 \mu\text{m}$ .

jeure partie de cette longueur est immergée dans la PCL, sauf pendant l'extension momentanée dans la couche de traction pendant la poussée effective. Ainsi dans ce modèle, la PCL est prise égale à  $5,4 \mu\text{m}$ , et la Couche de traction d'environ  $0,6 \mu\text{m}$ . L'épaisseur de la couche de mucus est de  $4 \mu\text{m}$ . La largeur de ce domaine a été prise considérablement plus grande que la hauteur, afin de compenser les effets de bord.

Un modèle à deux dimensions est créé (Roy et al., 2013), avec pour effet "les cils" représentés comme des forces de propulsion du corps dans la couche de traction et des forces de résistance visqueuse dans la PCL. Un modèle de visco-élasticité simple de Maxwell est utilisé et est établi à la couche de traction et à la couche de mucus.

La force de propulsion des cils est due à l'asymétrie du cycle de battement (*figure.1.8*). Lorsque les cils sont dans leur poussée effective, ils pénètrent dans la couche de traction, en poussant vers l'avant la couche de mucus. D'autre part, pendant la phase de récupération, les cils se baissent afin d'être complètement immergés dans la PCL. Par conséquent, la couche de mucus n'est pas tirée vers l'arrière pendant la phase de récupération (*ref.1.3.4*).

Les touffes de cils résistent à l'écoulement de PCL. En outre, lorsque les cils oscillent, le fluide à proximité de la surface d'un cil se déplace à une vitesse similaire à celle du cil. L'effet net de ces deux facteurs est que les cils réduisent le débit de la PCL, s'ils provoquent des oscillations importantes dans la PCL. La force de résistance, cependant, agit uniquement sur la PCL car les cils pénètrent difficilement l'une des deux autres couches.

### ***La force de résistance du fluide périciliaire***

Dans la direction horizontale :

$$f_{res}(x, y, t) = -\gamma_x^p(u - u_{cil}) \quad 0 < y < h \quad (1)$$

## .5 Le modèle physique

---

Dans la direction verticale :

$$g_{res}(x, y, t) = -\gamma_y^p(v - v_{cil}) \quad 0 < y < h \quad (2)$$

Où  $f_{res}$  et  $g_{res}$  sont les forces de résistance de la PCL dans les directions horizontale et verticale respectivement,  $\gamma_x^p$  et  $\gamma_y^p$  sont les coefficients de résistance de la PCL dans les axes x (horizontal) et y (vertical) respectivement ;  $u_{cil}$  et  $v_{cil}$  sont les vitesses de cils dans les axes x (horizontal) et y (vertical) respectivement ; u et v sont les vitesses résultant de la PCL à une valeur donnée des coordonnées (x, y, t) et h est la hauteur de la couche PCL.

Les expressions des vitesses des cils ont été formulées pour incorporer la périodicité du cycle de battement, l'augmentation linéaire de la vitesse avec la distance de l'épithélium et la durée courte de la course effective (environ 20% du cycle de battement). Ainsi, la formulation la plus précise pour la vitesse ciliaire est donnée ci-dessous (eq.(3.3) et (3.4)), après incorporation de la spécification que chaque cil génère une ellipse avec sa pointe (Ross and Corrsin, 1974).

### ***La vitesse des cils***

Dans la direction horizontale :

Dans la direction verticale :

Ici  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  où  $\lambda$  est la longueur d'onde (environ 30  $\mu\text{m}$ ),  $\sigma$  la fréquence de battement des cils (60 rad/s),  $\nu$  la fraction du battement de cils occupé par la poussée effective.

Les forces de propulsion dans ce modèle sont également formulées par un développement de Fourier. L'expression de ces forces indique qu'elles diminuent de façon monotone à zéro à partir de la base vers le sommet de la couche de traction.

### ***La force propulsive des cils (dans la couche de traction)***

Dans la direction horizontale :

Dans la direction verticale :

$$G_{prop}(x, y, t) = - \left( \sum_{n=1}^N g_n \sin[(kx + \sigma t)n] \right) \gamma_y^{M1} \left( \frac{\sin(\pi y/L)}{\sin(\pi h/L)} \right) \quad (3)$$

$\gamma$  est un coefficient de résistance qui dépend de la géométrie des cils et l'écart entre chaque cils. Il existe deux valeurs du coefficient de résistance distincts qui correspondent aux directions horizontale et verticale. Les valeurs des coefficients de résistance dépendent également de la viscosité dynamique du fluide pour laquelle elles sont calculées. Pour les deux directions x et y, les valeurs de  $\gamma$  sont de l'ordre de  $10^{12}$  en unité SI. Les différentes valeurs de  $\gamma$  pour la PCL et la couche de traction sont désignées à l'aide des exposants 'P' et 'M1' de la PCL et la couche de traction respectivement.

Tous les termes de force mentionnés jusqu'ici sont dans les unités de  $N/m^3$ .

### .6 Différentiation

Les macrophages peuvent se diviser en 4 catégories :

- Les macrophages résidents : Ils sont présents en permanence dans différents organes et permettent de détecter d'éventuelles inflammations.
- Les macrophages M0 : ils sont directement dérivés des monocytes après leur migration des réseaux capillaires vers les tissus enflammés, ces macrophages sont dits non activés.
- Les macrophages M1 : ils correspondent aux macrophages M0 activés par la cytokine IFN- $\gamma$ . Ces derniers sont aptes à phagocyter et tenter de tuer les parasites de la Leishmaniose (Martinez and Gordon, 2014).
- Les macrophages M2 : ils correspondent aux macrophages M0 activés par l'interleukine 4 (IL-4 et IL-13) et leur action est de soigner les tissus endommagés par l'inflammation (Martinez and Gordon, 2014).

Les macrophages résidents au niveau de l'inflammation vont sécréter du CNM I et II, ce qui va faire migrer et activer les lymphocytes T. Les lymphocytes T vont alors se différencier en Th1 et Th2 et sécréter à leur tour de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4 pour différencier les macrophages en M1 et M2. Ces quatre types de macrophages interviennent dans l'inflammation et l'infection causée par la piqûre du phlébotome (Lopes et al., 2014).

### .7 Cycle d'activation

Les macrophages résidents au niveau de la zone enflammée vont sécréter des générateurs de croissance (M-CSF, G-CSF, GM-CSF, PDGF) qui vont permettre aux monocytes de migrer en masse vers la zone d'inflammation. Puis les adhésines et les sélectines de surface des monocytes et des cellules endothéliales vont permettre l'adhérence des monocytes à la paroi de l'endothélium, puis la traversée. De plus, ces adhésines/sélectines sont plus denses au niveau des parois où se trouve l'inflammation ce qui augmente encore le nombre de monocytes. Une fois que les monocytes ont passé la membrane endothéliale, ils deviennent des macrophages qui s'activent sous l'influence de différentes cytokines (Pixley, 2012).

La distance entre deux vaisseaux dans le derme de la peau est de 20  $\mu\text{m}$

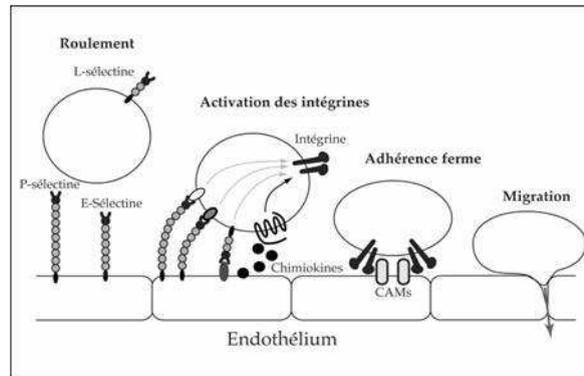


FIGURE 17 – Schéma de la migration des monocytes à travers la paroi endothéliale.  
source (Laferrrière, 2003)

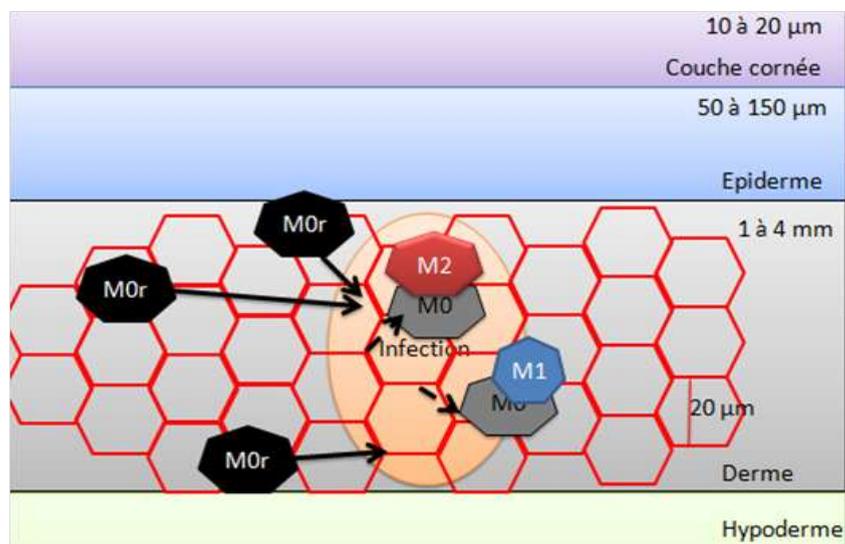


FIGURE 18 – Schéma des différentes couches de la peau.

donc, a priori, les macrophages qui auront passé la paroi du vaisseau capillaire vont migrer sur une distance maximale de 20  $\mu\text{m}$ . Les macrophages résidents eux doivent migrer dans le derme sur des distances plus longues pour atteindre la zone infectée.

Les cellules dendritiques et les neutrophiles sont des cellules du système immunitaire qui interviennent dans le cycle d'activation des macrophages lors d'une infection. Le schéma de ce cycle dans le cas de la leishmaniose se trouve sur la figure.19.

## .7 Cycle d'activation

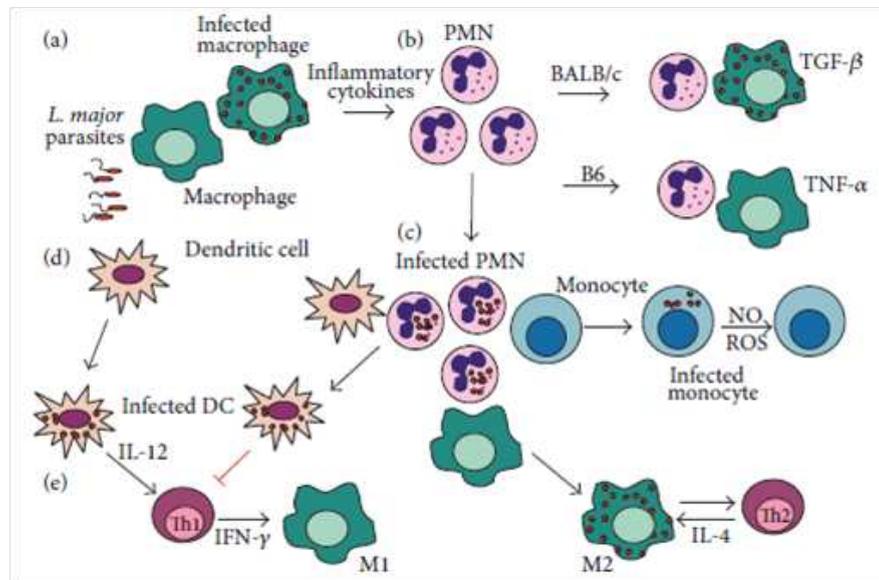


FIGURE 19 – Schéma des interactions Neutrophiles-Monocytes-Macrophages-Leishmanies. (Lopes et al., 2014)

Les dendritiques et les neutrophiles infectés par les parasites vont produire de la cytokine IL-12 ce qui va entraîner l'activation des macrophages M0 en M1. Or les M1 sont capables d'éliminer le parasite en produisant du monoxyde d'azote NO et en phagocytant. Au contraire, les macrophages M2 vont phagocyter les neutrophiles infectés sans pouvoir les détruire. Les parasites vont alors se reproduire dans ces macrophages jusqu'à provoquer leur lyse. Finalement, les macrophages M1 sont capables de tuer les parasites tandis que les M2 permettent leur prolifération (Lopes et al., 2014).

Les parasites vont réduire la production d'IL-12. Cela a pour conséquence directe la non-activation des Th1 et indirectement celle des M1 (Lopes et al., 2014). Bien que ce cycle d'activation soit connu, il n'en demeure pas moins que l'interaction initiale entre les macrophages et les parasites est mal connue. En effet, nous ne savons pas si les parasites sécrètent des molécules qui attirent les macrophages ou si c'est l'inflammation causée par la piqûre qui joue un rôle dans l'attraction des macrophages. En effet, les tissus étant endommagés, on peut supposer qu'une chaîne d'activation va attirer les macrophages et les activer en M2 pour permettre la cicatrisation.

## .8 Discussion

L'interaction initiale entre les macrophages et les leishmanies demeure à ce jour très mal connue. En effet, nous ne savons pas si, une fois injectées dans le derme de la peau, ce sont les leishmanies qui migrent vers les macrophages et provoquent leur phagocytose ou si ce sont les macrophages qui migrent vers les leishmanies pour les phagocyter. Pour des questions de temps, nous n'avons pas évalué la migration des leishmanies dans une matrice de collagène de type I. Cependant, dans un papier récent (Petropolis et al., 2014) il a été démontré que les leishmanies parcourent environ 140  $\mu\text{m}$  dans une matrice de collagène (de concentration similaire) en 72 heures en absence de macrophages. Par contre, en présence de macrophages, les leishmanies parcourent 66  $\mu\text{m}$  en 6 heures soit 528  $\mu\text{m}$  en 48 heures avec un taux de migration de  $0.05 \pm 0.2$ .

Basé sur ces mesures, nous avons estimé le pourcentage de macrophages qui peuvent être en contact direct avec les leishmanies sur les 12 premières heures. En effet, en 12 heures, les leishmanies ont pu explorer 172  $\mu\text{m}$  sur les 500  $\mu\text{m}$  de la zone proche des leishmanies. Sachant qu'il y a 8 parasites/macrophage dans notre microsystème et que le taux de migration des leishmanies est de 0.05, on considère que seuls 17.2 % des macrophages près des leishmanies ont pu entrer en contact avec elles.

Sur cette plage de temps le taux de migration des macrophages proches des leishmanies est plus important que celui des témoins. De plus ils ont une direction préférentielle qui est à l'opposé des leishmanies. On peut donc penser que les leishmanies produisent des molécules en quantité suffisamment grande pour affecter les macrophages se trouvant sur les 500 premiers  $\mu\text{m}$ . Au-delà de cette frontière les macrophages n'ont pas un taux différent de celui des témoins et n'ont pas une direction préférentielle. On peut supposer que dans cette zone la concentration de molécules émise par les leishmanies n'est pas suffisamment grande pour activer les macrophages. Notons cependant que ces molécules n'influent pas la vitesse des macrophages puisque sur les 12 premières heures, cette vitesse est la même pour les trois populations.

Au-delà de 18 h, la vitesse des macrophages proches des leishmanies com-

## .9 Migration des neutrophiles sous un gradient de leishmanies

---

mence à diminuer. Nous associons cette diminution à l'infection des macrophages par les parasites. S'ajoutent à cela une baisse du taux de migration et une perte de la directionnalité. En effet au bout de 24 h les parasites ont atteint au moins la moitié de la zone proche des leishmanies, avec un taux supérieur à 0.05, les macrophages étant encerclés par les leishmanies, ils ne peuvent plus fuir. Cette arrivée des leishmanies dans la première partie de la chambre augmente la concentration de molécules dans cette zone. De ce fait, les macrophages qui étaient initialement loin des leishmanies commencent à sentir leur présence et s'activent pour migrer, ce qui augmente le taux de migration.

Au bout de 48 h, la vitesse des macrophages proches des leishmanies continue à diminuer pour atteindre  $0.71 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{min}$  (contre  $\sim 6 \mu\text{m}/\text{min}$  au début de l'acquisition). La concentration de molécules à droite n'est toujours pas assez forte pour déclencher un mouvement directionnel des macrophages initialement loin des leishmanies.

## .9 Migration des neutrophiles sous un gradient de leishmanies

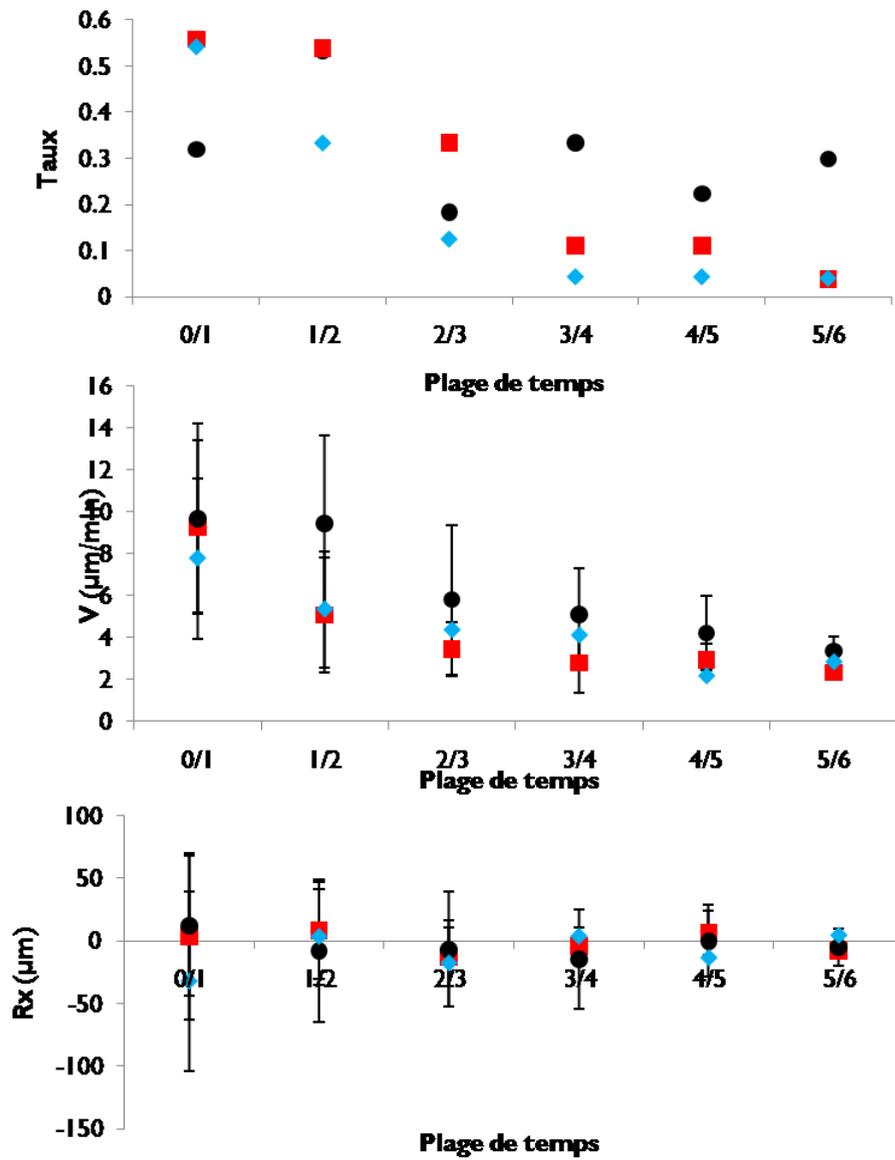


FIGURE 20 – Migration des neutrophiles soumis à un gradient de leishmanies : Taux de migration, vitesse instantanée et direction de migration.

# Bibliographie

- Damien Adam, Jacqueline Roux-Delrieu, Emilie Luczka, Arnaud Bonnomet, Julien Lesage, Jean-Claude Mérol, Myriam Polette, Michel Abély, and Christelle Coraux. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling : involvement of inflammation. *The Journal of Pathology*, 235(3) :408–419, 2015. ISSN 00223417. doi : 10.1002/path.4471. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/path.4471>.
- A M Agius, L A Smallman, and A L Pahor. Age, smoking and nasal ciliary beat frequency. *Clinical otolaryngology and allied sciences*, 23(3) :227–30, June 1998. ISSN 0307-7772. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9669071>.
- T Ahmed, D W Greenblatt, S Birch, B Marchette, and A Wanner. Abnormal mucociliary transport in allergic patients with antigen-induced bronchospasm : role of slow reacting substance of anaphylaxis. *The American review of respiratory disease*, 124(2) :110–4, August 1981. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7258824>.
- R E Albert, M Lippmann, and W Briscoe. The characteristics of bronchial clearance in humans and the effects of cigarette smoking. *Archives of environmental health*, 18(5) :738–55, May 1969. ISSN 0003-9896. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5781920>.
- Marcelo B Antunes, Bradford A Woodworth, Geeta Bhargave, Guoxiang Xiong, Jorge L Aguilar, Adam J Ratner, James L Kreindler, Ronald C Rubenstein, and Noam A Cohen. Murine nasal septa for respiratory epithelial air-liquid interface cultures. *BioTechniques*, 43(2) :195–6, 198, 200 passim, August 2007. ISSN 0736-6205. doi : 10.2144/000112493. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17824387>.
- R Beasley, W R Roche, J A Roberts, and S T Holgate. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *The American review of respi-*

- ratory disease, 139(3) :806–17, March 1989. ISSN 0003-0805. doi : 10.1164/ajrccm/139.3.806. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2923380>.
- Tahmina Begum, Humaira Naushaba, Jahangir Alam, Uttam Kumar Paul, Afshan Jesmin Alim, Jesmin Akter, and Ruksana Ahmed. Cadaveric Length of Trachea in Bangladeshi Adult Male. *Bangladesh Journal of Anatomy*, 7(1) : 42–44, 2009. ISSN 1817-065X. doi : 10.3329/bja.v7i1.3024.
- William D Bennett, Beth L Laube, Timothy Corcoran, Kirby Zeman, Gail Sharpless, Kristina Thomas, Jihong Wu, Peter J Mogayzel, Joseph Pilewski, and Scott Donaldson. Multisite comparison of mucociliary and cough clearance measures using standardized methods. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 26(3) :157–64, June 2013. ISSN 1941-2703. doi : 10.1089/jamp.2011.0909. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517172>.
- Saskia Bermbach, Karina Weinhold, Thomas Roeder, Frank Petersen, Christian Kugler, Torsten Goldmann, Jan Rupp, and Peter König. *Mechanisms of cilia-driven transport in the airways in the absence of mucus.*, volume 51. July 2014. ISBN 4515004034. doi : 10.1165/rcmb.2012-0530OC. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467665>.
- Abhiram R. Bhashyam, Peter J. Mogayzel, Sharon McGrath-Morrow, Enid Neptune, Alla Malinina, James Fox, and Beth L. Laube. A Pilot Study to Examine the Effect of Chronic Treatment with Immunosuppressive Drugs on Mucociliary Clearance in a Vagotomized Murine Model. *PLoS ONE*, 7(9) :3–9, 2012. ISSN 19326203. doi : 10.1371/journal.pone.0045312.
- J. Blake. Mucus flows. *Mathematical Biosciences*, 17(3-4) :301–313, 1973. ISSN 00255564. doi : 10.1016/0025-5564(73)90073-4.
- J E Boers, J L den Brok, J Koudstaal, J W Arends, and F B Thunnissen. Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 154(3 Pt 1) :758–763, 1996. ISSN 1073-449X. doi : 10.1164/ajrccm.154.3.8810616.
- Martin D Bootman, Tony J Collins, Lauren Mackenzie, H Llewelyn Roderick, Michael J Berridge, and Claire M Peppiatt. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent

## BIBLIOGRAPHIE

---

- inhibitor of InsP3-induced Ca<sup>2+</sup> release. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10) : 1145–1150, 2002. ISSN 08926638. doi : 10.1096/fj.02-0037rev.
- R. C. Boucher. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal*, 23(1) :146–158, 2004. ISSN 09031936. doi : 10.1183/09031936.03.00057003.
- Richard C Boucher. Airway surface dehydration in cystic fibrosis : pathogenesis and therapy. *Annual review of medicine*, 58 :157–70, January 2007. ISSN 0066-4219. doi : 10.1146/annurev.med.58.071905.105316. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217330>.
- J P Braat, G Ainge, J A Bowles, D H Richards, D Van Riessen, W J Visser, and E Rijntjes. The lack of effect of benzalkonium chloride on the cilia of the nasal mucosa in patients with perennial allergic rhinitis : a combined functional, light, scanning and transmission electron microscopy study. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 25(10) :957–65, October 1995. ISSN 0954-7894. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8556567>.
- Alex Braiman and Zvi Priel. Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating. *Respiratory physiology & neurobiology*, 163(1-3) : 202–7, November 2008. ISSN 1569-9048. doi : 10.1016/j.resp.2008.05.010. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18586580>.
- R G Breeze and E B Wheeldon. The cells of the pulmonary airways. *The American review of respiratory disease*, 116(4) :705–77, October 1977. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/921054>.
- C Brennen and H Winet. Fluid Mechanics of Propulsion by Cilia and Flagella. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 9(1) :339–398, 1977. ISSN 0066-4189. doi : 10.1146/annurev.fl.09.010177.002011.
- Brian Button and Richard C Boucher. Role of mechanical stress in regulating airway surface hydration and mucus clearance rates. *Respiratory physiology & neurobiology*, 163(1-3) :189–201, November 2008. ISSN 1569-9048. doi : 10.1016/j.resp.2008.04.020. URL

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2645865&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Brian Button, Li-Heng Cai, Camille Ehre, Mehmet Kesimer, David B Hill, John K Sheehan, Richard C Boucher, and Michael Rubinstein. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6097) : 937–41, August 2012. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1223012. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3633213&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Brian Button<sup>2</sup>, Li-heng Cai, Camille Ehre, Mehmet Kesimer, David B Hill, K John, Richard C Boucher, Michael Rubinstein, and John K Sheehan. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. SM. *Science (New York, N.Y.)*, 337 (6097) :937–41, August 2012. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1223012. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3633213&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

P Camner, B Mossberg, and K Philipson. Tracheobronchial clearance and chronic obstructive lung disease. *Scandinavian journal of respiratory diseases*, 54(5) : 272–81, January 1973. ISSN 0036-5572. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4777380>.

Zita Carvalho-Santos, Juliette Azimzadeh, José B Pereira-Leal, and Mónica Bettencourt-Dias. Evolution : Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *The Journal of cell biology*, 194(2) :165–75, July 2011. ISSN 1540-8140. doi : 10.1083/jcb.201011152. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3144413&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Mary Mann-Jong Chang, Laura Shih, and Reen Wu. Pulmonary Epithelium : Cell Types and Functions. In *The Pulmonary Epithelium in Health and Disease*, pages 1–26. John Wiley & Sons, Ltd, 2008. ISBN 9780470727010. doi : 10.1002/9780470727010.ch1. URL <http://dx.doi.org/10.1002/9780470727010.ch1>.

James F Chmiel, Melvin Berger, and Michael W Konstan. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clinical reviews in allergy & im-*

## BIBLIOGRAPHIE

---

- munology*, 23(1) :5–27, August 2002. ISSN 1080-0549. doi : 10.1385/CRIAI:23:1:005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12162106>.
- Semil P Choksi, Gilbert Lauter, Peter Swoboda, and Sudipto Roy. Switching on cilia : transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 141(7) :1427–41, 2014. ISSN 1477-9129. doi : 10.1242/dev.074666. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24644260>.
- C F Clary-Meinesz, J Cosson, P Huitorel, and B Blaive. Temperature effect on the ciliary beat frequency of human nasal and tracheal ciliated cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 76(3) : 335–8, January 1992. ISSN 0248-4900. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1305479>.
- H Cokuğraş, N Akçakaya, Seçkin, Y Camcioğlu, N Sarimurat, and F Aksoy. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax*, 56(1) :25–9, January 2001. ISSN 0040-6376. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1745903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Richard a Cone. Barrier properties of mucus. *Advanced drug delivery reviews*, 61 (2) :75–85, February 2009. ISSN 1872-8294. doi : 10.1016/j.addr.2008.09.008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135107>.
- Jeffrey L Cooper, Paul M Quinton, and Stephen T Ballard. Mucociliary transport in porcine trachea : differential effects of inhibiting chloride and bicarbonate secretion. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 304(3) :L184–90, February 2013. ISSN 1522-1504. doi : 10.1152/ajplung.00143.2012. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3567367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- M Cosentino Lagomarsino, P Jona, and B Bassetti. Metachronal waves for deterministic switching two-state oscillators with hydrodynamic interaction. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 68(2 Pt 1) :021908, 2003. ISSN 1063-651X. doi : 10.1103/PhysRevE.68.021908.
- Ronald G Crystal, Scott H Randell, John F Engelhardt, Judith Voynow, and Mary E Sunday. Airway epithelial cells : current concepts and challenges.

- Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(7) :772–7, September 2008. ISSN 1546-3222. doi : 10.1513/pats.200805-041HR. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757316>.
- C B Cyrus, B Yang, and T V McCaffrey. Leukotrienes C4 and D4 increase the ciliary beat frequency in human upper airway mucosa in vitro. *Otolaryngology–head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 118(4) :472–7, April 1998. ISSN 0194-5998. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9560097>.
- C William Davis and Burton F Dickey. Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annual review of physiology*, 70 :487–512, January 2008. ISSN 0066-4278. doi : 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100638. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17988208>.
- Michelle Dawson, Denis Wirtz, and Justin Hanes. Enhanced Viscoelasticity of Human Cystic Fibrotic Sputum Correlates with Increasing Microheterogeneity in Particle Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50) :50393–50401, 2003. ISSN 00219258. doi : 10.1074/jbc.M309026200.
- L.B. Wong D.B. Yeates, G.J. Besseris. *Physicochemical properties of mucus and its propulsion*. Philadelphia, the lung : edition, 1997. URL <http://tiger.uic.edu/~yeates-d/publications.html>.
- Lukas Didon, Rachel K Zwick, Ion Wa Chao, Matthew S Walters, Rui Wang, Neil R Hackett, and Ronald G Crystal. RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respiratory research*, 14 :70, January 2013. ISSN 1465-993X. doi : 10.1186/1465-9921-14-70. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3710277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- J M Diver, S O Sage, and J A Rosado. The inositol trisphosphate receptor antagonist 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) blocks Ca<sup>2+</sup> entry channels in human platelets : cautions for its use in studying Ca<sup>2+</sup> influx. *Cell calcium*, 30 (5) :323–9, November 2001. ISSN 0143-4160. doi : 10.1054/ceca.2001.0239. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733938>.
- Alice V Dubois, Patrick Midoux, Delphine Gras, Mustapha Si-Tahar, Déborah Bréa, Sylvie Attucci, Mustapha-Kamel Khelloufi, Reuben Ramphal, Patrice

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Diot, Francis Gauthier, and Virginie Hervé. Poly-L-Lysine compacts DNA, kills bacteria, and improves protease inhibition in cystic fibrosis sputum. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 188(6) :703–9, September 2013. ISSN 1535-4970. doi : 10.1164/rccm.201305-0912OC. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23947381>.
- M J Dulfano, K Adler, and W Philippoff. Sputum viscoelasticity in chronic bronchitis. *The American review of respiratory disease*, 104(1) :88–98, July 1971. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5556234>.
- M J Dulfano, C K Luk, M Beckage, and O Wooten. Ciliary inhibitory effects of asthma patients' sputum. *Clinical science (London, England : 1979)*, 63(4) : 393–6, October 1982. ISSN 0143-5221. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7105635>.
- M S DUNNILL. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *Journal of clinical pathology*, 13 :27–33, January 1960. ISSN 0021-9746. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=479992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Camille Ehre, Caroline Ridley, and David J. Thornton. Cystic fibrosis : An inherited disease affecting mucin-producing organs. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 52 :136–145, 2014. ISSN 18785875. doi : 10.1016/j.biocel.2014.03.011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.011>.
- B Y D A N Eshel, Z V I Priel, D Eshel, and Z V I Priel. Characterization of metachronal wave of beating cilia on frog's palate epithelium in tissue culture. *The Journal of physiology*, 388 :1–8, 1987. ISSN 00223751.
- John V Fahy and Burton F Dickey. Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine*, 363(23) :2233–47, December 2010. ISSN 1533-4406. doi : 10.1056/NEJMr0910061. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121836>.
- Ofer Fainaru, David Shseyov, Shay Hantisteanu, and Yoram Groner. Accelerated chemokine receptor 7-mediated dendritic cell migration in Runx3 knockout mice and the spontaneous development of asthma-like disease. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(30) : 10598–10603, 2005. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0504787102.

Reinhold Förster, Andreas Schubel, Dagmar Breitfeld, Elisabeth Kremmer, Ingrid Renner-Müller, Eckhard Wolf, and Martin Lipp. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1) :23–33, 1999. ISSN 00928674. doi : 10.1016/S0092-8674(00)80059-8.

W M Foster, E H Bergofsky, D E Bohning, M Lippmann, and R E Albert. Effect of adrenergic agents and their mode of action on mucociliary clearance in man. *Journal of applied physiology*, 41(2) :146–52, August 1976. ISSN 0021-8987. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/956095>.

W M Foster, E G Langenback, and E H Bergofsky. Disassociation in the mucociliary function of central and peripheral airways of asymptomatic smokers. *The American review of respiratory disease*, 132(3) :633–9, September 1985. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864009>.

W. Michael Foster, Dianne M. Walters, Malinda Longphre, Kristin Macri, and Laura M. Miller. Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol*, 90(3) :1111–1118, March 2001. URL <http://jap.physiology.org/content/90/3/1111.long>.

Richard Francis and Cecilia Lo. Ex vivo method for high resolution imaging of cilia motility in rodent airway epithelia. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (78) :e50343, 2013. ISSN 1940-087X. doi : 10.3791/50343. URL <http://www.jove.com/video/50343/ex-vivo-method-for-high-resolution-imaging-cilia-motility-rodent>.

Richard J B Francis, Bishwanath Chatterjee, Niki T Loges, Hanswalter Zentgraf, Heymut Omran, and Cecilia W Lo. Initiation and maturation of cilia-generated flow in newborn and postnatal mouse airway. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 296(6) :L1067–75, June 2009. ISSN 1040-0605. doi : 10.1152/ajplung.00001.2009. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2692794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- C Galabert, J Jacquot, J M Zahm, and E Puchelle. Relationships between the lipid content and the rheological properties of airway secretions in cystic fibrosis. *Clinica chimica acta ; international journal of clinical chemistry*, 164(2) : 139–49, April 1987. ISSN 0009-8981. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3594907>.
- L Gheber and Z Priel. On metachronism in ciliary systems : a model describing the dependence of the metachronal wave properties on the intrinsic ciliary parameters. *Cell motility and the cytoskeleton*, 16(3) :167–81, January 1990. ISSN 0886-1544. doi : 10.1002/cm.970160304. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2364445>.
- S Girod, J M Zahm, C Plotkowski, G Beck, and E Puchelle. Role of the physiochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. *The European respiratory journal*, 5(4) :477–87, April 1992. ISSN 0903-1936. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1563506>.
- Brigitte N Gomperts, Linda J Kim, Scott A Flaherty, and Brian P Hackett. IL-13 regulates cilia loss and foxj1 expression in human airway epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 37(3) :339–46, September 2007. ISSN 1044-1549. doi : 10.1165/rmb.2006-0400OC. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2720122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Clemens Grabher, Adam Cliffe, Kota Miura, Joel Hayflick, Rainer Pepperkok, Pernille Rø rth, and Joachim Wittbrodt. Birth and life of tissue macrophages and their migration in embryogenesis and inflammation in medaka. *Journal of leukocyte biology*, 81(1) :263–271, 2007. ISSN 0741-5400. doi : 10.1189/jlb.0806526.
- Delphine Gras, Arnaud Bourdin, Isabelle Vachier, Laure de Senneville, Caroline Bonnans, and Pascal Chanez. An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 129(5) :1259–1266.e1, May 2012. ISSN 1097-6825. doi : 10.1016/j.jaci.2012.01.073. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22409990>.
- T E Gray, K Guzman, C W Davis, L H Abdullah, and P Nettesheim. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial

- cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 14(1) :104–12, January 1996. ISSN 1044-1549. doi : 10.1165/ajrcmb.14.1.8534481. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8534481>.
- B R Grubb, J H Jones, and R C Boucher. Mucociliary transport determined by in vivo microdialysis in the airways of normal and CF mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 286(3) :L588–95, March 2004. ISSN 1040-0605. doi : 10.1152/ajplung.00302.2003. URL <http://ajplung.physiology.org/content/286/3/L588.long>.
- S Gueron and K Levit-Gurevich. Computation of the internal forces in cilia : application to ciliary motion, the effects of viscosity, and cilia interactions. *Biophysical journal*, 74(4) :1658–1676, 1998. ISSN 00063495. doi : 10.1016/S0006-3495(98)77879-8.
- S Gueron and K Levit-Gurevich. Energetic considerations of ciliary beating and the advantage of metachronal coordination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22) :12240–12245, 1999. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.96.22.12240.
- S Gueron and N Liron. Ciliary motion modeling, and dynamic multicilia interactions. *Biophysical journal*, 63(4) :1045–1058, 1992. ISSN 00063495. doi : 10.1016/S0006-3495(92)81683-1.
- S Gueron, K Levit-Gurevich, N Liron, and J J Blum. Cilia internal mechanism and metachronal coordination as the result of hydrodynamical coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12) :6001–6006, 1997. ISSN 00278424. doi : 10.1073/pnas.94.12.6001.
- Pranab Haldar and Ian D. Pavord. Noneosinophilic asthma : A distinct clinical and pathologic phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(5) :1043–1052, 2007. ISSN 00916749. doi : 10.1016/j.jaci.2007.02.042.
- Hamida Hammad and Bart N Lambrecht. Dendritic cells and epithelial cells : linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature reviews. Immunology*, 8(3) :193–204, March 2008. ISSN 1474-1741. doi : 10.1038/nri2275. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nri2275>.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Hamida Hammad, Bart N Lambrecht, Pierre Pochard, Philippe Gosset, Philippe Marquillies, André-Bernard Tonnel, and Joël Pestel. Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice : involvement of CCR7. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(3) :1524–1534, 2002. ISSN 0022-1767. doi : 10.4049/jimmunol.169.3.1524.
- Emanuela Handman. Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development  
Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2) :229–243, 2001. ISSN 08938512. doi : 10.1128/CMR.14.2.229.
- Christine L Hatstrup and Sandra J Gendler. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual review of physiology*, 70 :431–57, January 2008. ISSN 0066-4278. doi : 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850209>.
- J C Hedges, C a Singer, and W T Gerthoffer. Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 23(1) :86–94, 2000. ISSN 1044-1549. doi : 10.1165/ajrcmb.23.1.4014.
- Justina Hessel, Jonna Heldrich, Jennifer Fuller, Michelle R Staudt, Sharon Radisch, Charleen Hollmann, Ben-Gary Harvey, Robert J Kaner, Jacqueline Salit, Jenny Yee-Levin, Sriram Sridhar, Sreekumar Pillai, Holly Hilton, Gerhard Wolff, Hans Bitter, Sudha Visvanathan, Jay Fine, Christopher S Stevenson, Ronald G Crystal, and Ann E Tilley. Intraflagellar transport gene expression associated with short cilia in smoking and COPD. *PloS one*, 9 (1) :e85453, January 2014. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0085453. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3896362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hilding. The relation of ciliary insufficiency to death from asthma and other respiratory diseases. *Journal of Allergy*, 14(4) :351–352, May 1943. ISSN 00218707. doi : 10.1016/S0021-8707(43)90689-6. URL <http://www.jacionline.org/article/S0021870743906896/fulltext>.
- David B Hill, Paula A Vasquez, John Mellnik, Scott A McKinley, Aaron Vose, Frank Mu, Ashley G Henderson, Scott H Donaldson, Neil E Alexis, Ri-

- chard C Boucher, and M Gregory Forest. A biophysical basis for mucus solids concentration as a candidate biomarker for airways disease. *PloS one*, 9(2) :e87681, January 2014. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0087681. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3928107&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Robert a Hirst, Claire L Jackson, Janice L Coles, Gwyneth Williams, Andrew Rutman, Patricia M Goggin, Elizabeth C Adam, Anthony Page, Hazel J Evans, Peter M Lackie, Christopher O'Callaghan, and Jane S Lucas. Culture of primary ciliary dyskinesia epithelial cells at air-liquid interface can alter ciliary phenotype but remains a robust and informative diagnostic aid. *PloS one*, 9(2) :e89675, January 2014. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0089675. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3934921&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- James C. Ho, Kwok N. Chan, Wayne H. Hu, Wah K. Lam, Ling Zheng, George L. Tipoe, June Sun, Raymond Leung, and Kenneth W. Tsang. The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(4) : 983–988, 2001. ISSN 1073449X. doi : 10.1164/ajrccm.163.4.9909121.
- M. E J Holwill, G. F. Foster, T. Hamasaki, and P. Satir. Biophysical aspects and modelling of ciliary motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 32(2) :114–120, 1995. ISSN 08861544. doi : 10.1002/cm.970320209.
- Jennifer L. Ingram and Monica Kraft. IL-13 in asthma and allergic disease : Asthma phenotypes and targeted therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(4) :829–842, 2012. ISSN 00916749. doi : 10.1016/j.jaci.2012.06.034. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.034>.
- Hiroaki Ishikawa and Wallace F Marshall. Ciliogenesis : building the cell's antenna. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(4) :222–34, April 2011. ISSN 1471-0080. doi : 10.1038/nrm3085. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21427764>.
- Barbara Jachimska, Monika Wasilewska, and Zbigniew Adamczyk. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir : the ACS journal of*

## BIBLIOGRAPHIE

---

- surfaces and colloids*, 24(13) :6866–72, June 2008. ISSN 0743-7463. doi : 10.1021/la800548p. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512882>.
- Frode L Jahnsen, Deborah H Strickland, Jennifer a Thomas, Iriani T Tobagus, Sylvia Napoli, Graeme R Zosky, Debra J Turner, Peter D Sly, Philip a Stumbles, and Patrick G Holt. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(9) :5861–5867, 2006. ISSN 0022-1767. doi : 177/9/5861[pii].
- Raksha Jain, Jennifer M Ray, Jie-hong Pan, and Steven L Brody. Sex hormone-dependent regulation of cilia beat frequency in airway epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 46(4) :446–53, April 2012. ISSN 1535-4989. doi : 10.1165/rcmb.2011-0107OC. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3359952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- P.G. Jayathilake, Zhijun Tan, D.V. Le, H.P. Lee, and B.C. Khoo. Three-dimensional numerical simulations of human pulmonary cilia in the periciliary liquid layer by the immersed boundary method. *Computers & Fluids*, 67 :130–137, 2012. ISSN 00457930. doi : 10.1016/j.compfluid.2012.07.016.
- A Jeanneret-Grosjean, M King, M C Michoud, H Liote, and R Amyot. Sampling technique and rheology of human tracheobronchial mucus. *The American review of respiratory disease*, 137(3) :707–10, March 1988. ISSN 0003-0805. doi : 10.1164/ajrccm/137.3.707. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3345048>.
- S Joki, V Saano, T Koskela, E Toskala, M A Bray, and J Nuutinen. Effect of leukotriene D4 on ciliary activity in human, guinea-pig and rat respiratory mucosa. *Pulmonary pharmacology*, 9(4) :231–8, August 1996. ISSN 0952-0600. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160411>.
- Darryl A. KNIGHT and Stephen T. HOLGATE. The airway epithelium : Structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 8(4) :432–446, December 2003. ISSN 1323-7799. doi : 10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x>.

- Michael R Knowles and Richard C Boucher. Innate defenses in the lung Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *North*, 109(5) :571–577, 2002. doi : 10.1172/JCI200215217.The.
- Daisuke Kobayashi and Hiroyuki Takeda. Ciliary motility : the components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins. *Differentiation ; research in biological diversity*, 83(2) :S23–9, February 2012. ISSN 1432-0436. doi : 10.1016/j.diff.2011.11.009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22154137>.
- V Koblizek, M Tomsova, E Cermakova, P Papousek, S Pracharova, R A A Mandalia, J Ceral, J Novosad, L Fila, V Sedlak, J Ruta, V Bartos, F Salajka, and M Hrcniarik. Impairment of nasal mucociliary clearance in former smokers with stable chronic obstructive pulmonary disease relates to the presence of a chronic bronchitis phenotype. *Rhinology*, 49(4) :397–406, October 2011. ISSN 0300-0729. doi : 10.4193/Rhino11.051. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21991564>.
- Mitsuko Kondo, Jun Tamaoki, Kiyoshi Takeyama, Junko Nakata, and Atsushi Nagai. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from guinea pig tracheal epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(5) :536–541, 2002. ISSN 10441549. doi : 10.1165/rcmb.4682.
- Mitsuko Kondo, Jun Tamaoki, Kiyoshi Takeyama, Kazuo Isono, Kiyomi Kawatani, Takehiro Izumo, and Atsushi Nagai. Elimination of IL-13 reverses established goblet cell metaplasia into ciliated epithelia in airway epithelial cell culture. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 55(3) :329–336, 2006. ISSN 1323-8930. doi : 10.2332/allergolint.55.329.
- M E Krouse. Is cystic fibrosis lung disease caused by abnormal ion composition or abnormal volume ? *The Journal of general physiology*, 118(2) :219–222, 2001. ISSN 00221295. doi : 10.1085/jgp.118.2.219.
- Julie Laferrière. Interaction des cellules cancéreuses avec l'endothélium vasculaire dans le processus métastatique, 2003. URL <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/21038/21038.html>.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- M. Cosentino Lagomarsino, B. Bassetti, and P. Jona. Rowers coupled hydrodynamically. Modeling possible mechanisms for the cooperation of cilia. 88 : 81–88, 2002. ISSN 1434-6028. doi : 10.1140/epjb/e20020069. URL <http://arxiv.org/abs/cond-mat/0104046>.
- Samuel K Lai, D Elizabeth O’Hanlon, Suzanne Harrold, Stan T Man, Ying-Ying Wang, Richard Cone, and Justin Hanes. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(5) :1482–1487, 2007. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0608611104.
- Samuel K Lai, Ying-Ying Wang, Denis Wirtz, and Justin Hanes. Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced drug delivery reviews*, 61(2) : 86–100, February 2009. ISSN 1872-8294. doi : 10.1016/j.addr.2008.09.012. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2736374&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- L A Laitinen, M Heino, A Laitinen, T Kava, and T Haahtela. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *The American review of respiratory disease*, 131(4) :599–606, April 1985. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3994155>.
- Hilaire C Lam, Suzanne M Cloonan, Abhiram R Bhashyam, Jeffery A Haspel, Anju Singh, J Fah Sathirapongsasuti, Morgan Cervo, Hongwei Yao, Anna L Chung, Kenji Mizumura, Chang Hyeok An, Bin Shan, Jonathan M Franks, Kathleen J Haley, Caroline A Owen, Yohannes Tesfaigzi, George R Washko, John Quackenbush, Edwin K Silverman, Irfan Rahman, Hong Pyo Kim, Ashfaq Mahmood, Shyam S Biswal, Stefan W Ryter, and Augustine M K Choi. Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *The Journal of clinical investigation*, 123(12) :5212–30, December 2013. ISSN 1558-8238. doi : 10.1172/JCI69636. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3859407&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- B N Lambrecht, B Salomon, D Klatzmann, and R a Pauwels. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(8) :4090–4097, 1998. ISSN 0022-1767.

- Jamila Laoukili, Eric Perret, Tom Willems, Adrian Minty, Eef Parthoens, Odile Houcine, Andre Coste, Mark Jorissen, Francelyne Marano, Daniel Caput, and Frédéric Tournier. IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 108(12) : 1817–1824, 2001. ISSN 00219738. doi : 10.1172/JCI200113557.
- John C Lay, Mark R Stang, Paul E Fisher, James R Yankaskas, and William D Bennett. Airway retention of materials of different solubility following local intrabronchial deposition in dogs. *Journal of aerosol medicine : the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine*, 16(2) :153–66, January 2003. ISSN 0894-2684. doi : 10.1089/089426803321919915. URL <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/089426803321919915>.
- John F Lechner and Moira a Laveck. PROCEDURE NO . 41402 A SERUM-FREE METHOD FOR CULTURING NORMAL HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS AT CLONAL DENSITY In Vitro Carcinogenesis Section , Laboratory of Human Carcinogenesis , National Cancer Institute , National Institutes of Health , Bethesda , . *Methods*, (41402), 1985.
- R M Lee, C M Rossman, and H O’Brodivich. Assessment of postmortem respiratory ciliary motility and ultrastructure. *The American review of respiratory disease*, 136(2) :445–7, August 1987. ISSN 0003-0805. doi : 10.1164/ajrccm/136.2.445. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3619203>.
- W.L. Lee, P.G. Jayathilake, Zhijun Tan, D.V. Le, H.P. Lee, and B.C. Khoo. Mucociliary transport : Effect of mucus viscosity, cilia beat frequency and cilia density. *Computers & Fluids*, 49(1) :214–221, October 2011. ISSN 00457930. doi : 10.1016/j.compfluid.2011.05.016. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045793011001861>.
- Peter Lenz and Andrey Ryskin. Collective effects in ciliar arrays. *Physical biology*, 3(4) :285–294, 2006. ISSN 1478-3975. doi : 10.1088/1478-3975/3/4/006.
- Philip L Leopold, Michael J O’Mahony, X Julie Lian, Ann E Tilley, Ben-Gary Harvey, and Ronald G Crystal. Smoking is associated with shortened airway cilia. *PloS one*, 4(12) :e8157, January 2009. ISSN 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0008157. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2790614&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- N Liron. On peristaltic flow and its efficiency. *Bulletin of mathematical biology*, 38 (06) :573–96, January 1976. ISSN 0092-8240. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/990544>.
- Tingjiao Liu, Chunyu Li, Hongjing Li, Shaojiang Zeng, Jianhua Qin, and Bingcheng Lin. A microfluidic device for characterizing the invasion of cancer cells in 3-D matrix. *Electrophoresis*, 30(24) :4285–91, December 2009. ISSN 1522-2683. doi : 10.1002/elps.200900289. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013914>.
- D C Look, M J Walter, M R Williamson, L Pang, Y You, J N Sreshta, J E Johnson, D S Zander, and S L Brody. Effects of paramyxoviral infection on airway epithelial cell Foxj1 expression, ciliogenesis, and mucociliary function. *The American journal of pathology*, 159(6) :2055–2069, 2001. ISSN 00029440. doi : 10.1016/S0002-9440(10)63057-X.
- Marcela Freitas Lopes, Ana Caroline Costa-Da-Silva, and George Alexandre Dosreis. Innate immunity to Leishmania infection : Within phagocytes. *Mediators of Inflammation*, 2014, 2014. ISSN 14661861. doi : 10.1155/2014/754965.
- P M Low, C K Luk, M J Dulfano, and P J Finch. Ciliary beat frequency of human respiratory tract by different sampling techniques. *The American review of respiratory disease*, 130(3) :497–8, September 1984. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6383156>.
- C K Luk and M J Dulfano. Effect of pH, viscosity and ionic-strength changes on ciliary beating frequency of human bronchial explants. *Clinical science (London, England : 1979)*, 64(4) :449–51, April 1983. ISSN 0143-5221. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825413>.
- Fernando O Martinez and Siamon Gordon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *F1000prime reports*, 6(March) :13, 2014. ISSN 2051-7599. doi : 10.12703/P6-13. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3944738&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- H Matsui, S H Randell, S W Peretti, C W Davis, and R C Boucher. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from

- airway surfaces. *The Journal of clinical investigation*, 102(6) : 1125–31, September 1998. ISSN 0021-9738. doi : 10.1172/JCI2687. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=509095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- L W MATTHEWS, S SPECTOR, J LEMM, and J L POTTER. STUDIES ON PULMONARY SECRETIONS. I. THE OVER-ALL CHEMICAL COMPOSITION OF PULMONARY SECRETIONS FROM PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS, BRONCHIECTASIS, AND LARYNGECTOMY. *The American review of respiratory disease*, 88 :199–204, August 1963. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14045224>.
- a S McWilliam, D Nelson, J a Thomas, and P G Holt. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *The Journal of experimental medicine*, 179(4) :1331–1336, 1994. ISSN 0022-1007. doi : 10.1084/jem.179.4.1331.
- R R Mercer, M L Russell, V L Roggli, and J D Crapo. Cell number and distribution in human and rat airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 10(6) :613–624, June 1994. ISSN 1044-1549. doi : 10.1165/ajrcmb.10.6.8003339. URL <http://dx.doi.org/10.1165/ajrcmb.10.6.8003339>.
- R J Mezey, M A Cohn, R J Fernandez, A J Januszkiewicz, and A Wanner. Mucociliary transport in allergic patients with antigen-induced bronchospasm. *The American review of respiratory disease*, 118(4) :677–84, October 1978. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/101106>.
- B Mossberg, K Philipson, and P Camner. Tracheobronchial clearance in patients with emphysema associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Scandinavian journal of respiratory diseases*, 59(1) :1–7, February 1978. ISSN 0036-5572. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/306680>.
- Ki Okamoto and Y Nakaoka. Reconstitution of Metachronal Waves in Ciliated Cortical Sheets of Paramecium - Wave Stabilities. *The Journal of experimental biology*, 192(1) :61–72, 1994. ISSN 1477-9145. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317363>.
- Amy L Oldenburg, Raghav K Chhetri, David B Hill, and Brian Button. Monitoring airway mucus flow and ciliary activity with op-

## BIBLIOGRAPHIE

---

- tical coherence tomography. *Biomedical optics express*, 3(9) :1978–92, September 2012. ISSN 2156-7085. doi : 10.1364/BOE.3.001978. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3447542&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lawrence E Ostrowski, Weining Yin, Troy D Rogers, Katie B Busalacchi, Michael Chua, Wanda K O’Neal, and Barbara R Grubb. Conditional deletion of *dnaic1* in a murine model of primary ciliary dyskinesia causes chronic rhinosinusitis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 43(1) :55–63, July 2010. ISSN 1535-4989. doi : 10.1165/rcmb.2009-0118OC. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2911571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jeremy C. Parker, Surendran Thavagnanam, Grzegorz Skibinski, Michael McBrien, Liam G. Heaney, and Michael D. Shields. IL-31 does not induce normal human ciliated epithelial cells to differentiate into a phenotype consistent with the pathophysiology of asthma. *Results in Immunology*, 2 :104–111, 2012. ISSN 22112839. doi : 10.1016/j.rinim.2012.05.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.rinim.2012.05.001>.
- Eduardo Parrilla, Miguel Armengot, Manuel Mata, Julio Cortijo, Jaime Riera, José L Hueso, and David Moratal. Ciliary motility activity measurement using a dense optical flow algorithm. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 2013 :4446–9, January 2013. ISSN 1557-170X. doi : 10.1109/EMBC.2013.6610533. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24110720>.
- D Pavia, M L Thomson, and S J Pocock. Evidence for temporary slowing of mucociliary clearance in the lung caused by tobacco smoking. *Nature*, 231 (5301) :325–6, June 1971. ISSN 0028-0836. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4930988>.
- Debora B Petropolis, Juliany C F Rodrigues, Nathan B Viana, Bruno Pontes, Camila F a Pereira, and Fernando C Silva-Filho. *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture : an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. *PeerJ*, 2 :e317, 2014. ISSN 2167-8359. doi : 10.7717/peerj.

317. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3994643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Fiona J. Pixley. Macrophage migration and its regulation by CSF-1. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 2012. ISSN 16878876. doi : 10.1155/2012/501962.

E Puchelle, J M Tournier, A Petit, J M Zahm, D Lauque, M Vidailhet, and P Sadooul. The frog palate for studying mucus transport velocity and mucociliary frequency. *European journal of respiratory diseases. Supplement*, 128 (Pt 1) : 293–303, January 1983. ISSN 0106-4347. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6604652>.

E Puchelle, J M Zahm, and D Quemada. Rheological properties controlling mucociliary frequency and respiratory mucus transport. *Biorheology*, 24(6) :557–63, January 1987. ISSN 0006-355X. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3502756>.

Tina Raman, Timothy P O'Connor, Neil R Hackett, Wei Wang, Ben-Gary Harvey, Marc A Attiyeh, David T Dang, Matthew Teater, and Ronald G Crystal. Quality control in microarray assessment of gene expression in human airway epithelium. *BMC genomics*, 10 :493, January 2009. ISSN 1471-2164. doi : 10.1186/1471-2164-10-493. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2774870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Ercy Mara Cipulo Ramos, Alessandra Choqueta De Toledo, Rafaella Fagundes Xavier, Luciana Cristina Fosco, Rodolfo Paula Vieira, Dionei Ramos, and José Roberto Jardim. Reversibility of impaired nasal mucociliary clearance in smokers following a smoking cessation programme. *Respirology*, 16(5) :849–855, 2011. ISSN 13237799. doi : 10.1111/j.1440-1843.2011.01985.x.

Emma L Rawlins, Lawrence E Ostrowski, Scott H Randell, and Brigid L M Hogan. Lung development and repair : contribution of the ciliated lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2) :410–7, January 2007. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0610770104. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1752191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Bertrand D E Raynal, Timothy E Hardingham, David J Thornton, and John K Sheehan. Concentrated solutions of salivary MUC5B mucin do not replicate the gel-forming properties of saliva. *The Biochemical journal*, 362(Pt 2) :289–296, 2002. ISSN 02646021. doi : 10.1042/0264-6021:3620289.
- Lorena Riol-Blanco, Noelia Sánchez-Sánchez, Ana Torres, Alberto Tejedor, Shuh Narumiya, Angel L Corbí, Paloma Sánchez-Mateos, and José Luis Rodríguez-Fernández. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(7) :4070–4080, 2005. ISSN 0022-1767. doi : 10.4049/jimmunol.174.7.4070.
- Duncan F. Rogers. The airway goblet cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(1) :1–6, 2003. ISSN 13572725. doi : 10.1016/S1357-2725(02)00083-3.
- S M Ross and S Corrsin. Results of an analytical model of mucociliary pumping. *Journal of Applied Physiology*, 37(3) :333–340, September 1974. URL <http://jap.physiology.org/content/37/3/333.abstract>.
- Yagnaseni Roy, Vivek Sivathanu, and Sarit K. Das. Effect of bunching of cilia and their interplay on muco-ciliary transport. *Computers in Biology and Medicine*, 43(11) :1758–1772, 2013. ISSN 00104825. doi : 10.1016/j.compbimed.2013.08.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbimed.2013.08.014>.
- B K Rubin, O Ramirez, J G Zayas, B Finegan, and M King. Collection and analysis of respiratory mucus from subjects without lung disease. *The American review of respiratory disease*, 141(4 Pt 1) :1040–3, April 1990. ISSN 0003-0805. doi : 10.1164/ajrccm/141.4\\_Pt\\_1.1040. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2327638>.
- Bruce K Rubin. Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatric respiratory reviews*, 8(1) :4–7, March 2007. ISSN 1526-0542. doi : 10.1016/j.prrv.2007.02.004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17419972>.
- J. R. Sabater, Y. M. Mao, C. Shaffer, M. K. James, T. G. O’Riordan, and W. M. Abraham. Aerosolization of P2Y2-receptor agonists enhances mucociliary clearance in sheep. *J Appl Physiol*, 87(6) :2191–2196, December 1999. URL <http://jap.physiology.org/content/87/6/2191.long>.

- Matthias Salathe. Regulation of mammalian ciliary beating. *Annual review of physiology*, 69 :401–22, January 2007. ISSN 0066-4278. doi : 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141253. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945069>.
- A. Salathe, M., O’Riordan, T. G. and Wanner. *Mucociliary clearance. in The Lung : Scientific Foundations*. Number vol.~2 in *The Lung : Scientific Foundations*. Lippincott-Raven, Philadelphia : Lippincott-Raven, 1997. ISBN 9780397516322. URL [https://books.google.co.uk/books?id=ru\\_3SgAACAAJ](https://books.google.co.uk/books?id=ru_3SgAACAAJ).
- J M Samet and P W Cheng. The role of airway mucus in pulmonary toxicology. *Environmental health perspectives*, 102 Suppl(3) :89–103, June 1994. ISSN 0091-6765. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1567079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Noelia Sánchez-Sánchez, Lorena Riol-Blanco, and José Luis Rodríguez-Fernández. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(9) :5153–5159, 2006. ISSN 0022-1767. doi : 10.4049/jimmunol.176.9.5153.
- M J Sanderson and M A Sleight. CILIARY ACTIVITY OF CULTURED RABBIT TRACHEAL EPITHELIUM : BEAT PATTERN AND METACHRONY. *Cell*, 347 : 331–347, 1981.
- P Satir. Mechanisms and controls of microtubule sliding in cilia. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 35 :179–201, 1982. ISSN 0081-1386 (Print).
- Peter Satir and Søren T Christensen. Structure and function of mammalian cilia. *Histochemistry and cell biology*, 129(6) :687–93, June 2008. ISSN 0948-6143. doi : 10.1007/s00418-008-0416-9. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2386530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Andreas Schmid and Matthias Salathe. Ciliary beat co-ordination by calcium. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 103(4) :159–69, April 2011. ISSN 1768-322X. doi : 10.1042/BC20100120. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401526>.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- P J Schuil, J M van Gelder, M ten Berge, K Graamans, and E H Huizing. Histamine and leukotriene C4 effects on in vitro ciliary beat frequency of human upper respiratory cilia. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EU-FOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 251(6) :325–8, January 1994. ISSN 0937-4477. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7848641>.
- Patrick R Sears, Wei-Ning Yin, and Lawrence E. Ostrowski. Continuous Mucociliary Transport by Primary Human Airway Epithelial Cells in vitro. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, (919) : ajplung.00024.2015, 2015. ISSN 1040-0605. doi : 10.1152/ajplung.00024.2015. URL <http://ajplung.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajplung.00024.2015>.
- H. Seo, S.-H. Kim, J.-H. Choi, J.-Y. Hong, and J.-H. Hwang. Effect of heated humidified ventilation on bronchial mucus transport velocity in general anaesthesia : A randomized trial. *Journal of International Medical Research*, 42 : 1222–1231, 2014. ISSN 0300-0605. doi : 10.1177/0300060514548291. URL <http://imr.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300060514548291>.
- Renat Shaykhiev, Fouad Otaki, Prince Bonsu, David T Dang, Matthew Teater, Yael Strulovici-Barel, Jacqueline Salit, Ben-Gary Harvey, and Ronald G Crystal. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(5) :877–92, March 2011. ISSN 1420-9071. doi : 10.1007/s00018-010-0500-x. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3838912&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- J K Sheehan, C Brazeau, S Kutay, H Pigeon, S Kirkham, M Howard, and D J Thornton. Physical characterization of the MUC5AC mucin : a highly oligomeric glycoprotein whether isolated from cell culture or in vivo from respiratory mucous secretions. *The Biochemical journal*, 347 Pt 1 :37–44, 2000. ISSN 02646021. doi : 10.1042/0264-6021:3470037.
- A. Shoemark and C. Hogg. Electron tomography of respiratory cilia. *Thorax*, 68(2) :190–191, November 2012. ISSN 0040-6376. doi : 10.

- 1136/thoraxjnl-2012-202938. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192883>.
- M A Sleigh, J R Blake, and N Liron. The propulsion of mucus by cilia. *The American review of respiratory disease*, 137(3) :726–41, March 1988. ISSN 0003-0805. doi : 10.1164/ajrccm/137.3.726. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3278666>.
- B L Slomiany and A Slomiany. Role of mucus in gastric mucosal protection. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 42(2) :147–61, June 1991. ISSN 0867-5910. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1782415>.
- D. J. Smith, E. a. Gaffney, and J. R. Blake. A viscoelastic traction layer model of muco-ciliary transport. *Bulletin of Mathematical Biology*, 69(1) :289–327, 2007. ISSN 00928240. doi : 10.1007/s11538-005-9036-x.
- W Stahlhofen, J Gebhart, J Heyder, K Philipson, and P Camner. Intercomparison of regional deposition of aerosol particles in the human respiratory tract and their long-term elimination. *Experimental lung research*, 2(2) :131–9, May 1981. ISSN 0190-2148. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7274177>.
- M R Staudt, A Rogalski, A E Tilley, R J Kaner, B Harvey, and R G Crystal. Smoking Is Associated With A Loss Of Ciliated Cells Throughout The Airways. *AmJ Resp Crit Care Med - Meeting Abstracts*, page 107882, 2014. doi : 10.1164/ajrccm-conference.2014.189.1\\_MeetingAbstracts.A4097(2014).
- Magnus Svartengren, R. Falk, and K. Philipson. Long-term clearance from small airways decreases with age. *European Respiratory Journal*, 26(4) :609–615, 2005. ISSN 09031936. doi : 10.1183/09031936.05.00002105.
- Sidney L Tamm, T M Sonneborn, and Ruth V Dippell. THE OF ROLE THE OF CORTICAL OF ORIENTATION BEAT IN THE CONTROL DIRECTION IN PARAMECIUM From the Division of Biological Sciences , Department of Zoology , Indiana University , Bloomington , Downloaded from [jcb.rupress.org](http://jcb.rupress.org) on June 17 , 2015 The swimming. 64 :98–112, 1975.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Benjamin C Tang, Michelle Dawson, Samuel K Lai, Ying-Ying Wang, Jung Soo Suk, Ming Yang, Pamela Zeitlin, Michael P Boyle, Jie Fu, and Justin Hanes. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46) :19268–19273, 2009. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0905998106.
- Robert Tarran. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(1) : 42–6, January 2004. ISSN 1546-3222. doi : 10.1513/pats.2306014. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113411>.
- Robert Tarran, Brian Button, Maryse Picher, Anthony M Paradiso, Carla M Ribeiro, Eduardo R Lazarowski, Liqun Zhang, Peter L Collins, Raymond J Pickles, Jeffrey J Fredberg, and Richard C Boucher. Normal and cystic fibrosis airway surface liquid homeostasis. The effects of phasic shear stress and viral infections. *The Journal of biological chemistry*, 280(42) :35751–9, October 2005. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.M505832200. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2924153&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zvi Teff, Zvi Priel, and Levi A Gheber. Forces Applied by Cilia Measured on Explants from Mucociliary Tissue. *Biophysical Journal*, 92(5) :1813–1823, 2007. ISSN 0006-3495. doi : 10.1529/biophysj.106.094698. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.094698>.
- Zvi Teff, Zvi Priel, and Levi a Gheber. The forces applied by cilia depend linearly on their frequency due to constant geometry of the effective stroke. *Biophysical journal*, 94(1) :298–305, January 2008. ISSN 1542-0086. doi : 10.1529/biophysj.107.111724. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2134883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Biju Thomas, Andrew Rutman, Robert a Hirst, Pranab Haldar, Andrew J Wardlaw, John Bankart, Christopher E Brightling, and Christopher O’Callaghan. Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126(4) :722–729.e2, October

2010. ISSN 1097-6825. doi : 10.1016/j.jaci.2010.05.046. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673980>.
- Ann E Tilley, Matthew S Walters, Renat Shaykhiev, and Ronald G Crystal. Cilia dysfunction in lung disease. *Annual review of physiology*, 77 :379–406, February 2015. ISSN 1545-1585. doi : 10.1146/annurev-physiol-021014-071931. URL [http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-physiol-021014-071931?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-physiol-021014-071931?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed).
- M I Ugwoke, N Verbeke, and R Kinget. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 53 (1) :3–21, January 2001. ISSN 0022-3573. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11206189>.
- A J Veerman, L van Delden, L Feenstra, and W Leene. The immotile cilia syndrome : phase contrast light microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Pediatrics*, 65(4) :698–702, April 1980. ISSN 0031-4005. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6966048>.
- José A Villadangos and Petra Schnorrer. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature reviews. Immunology*, 7(7) :543–55, July 2007. ISSN 1474-1733. doi : 10.1038/nri2103. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nri2103>.
- Adam Wanner, Matthias Salathe, and Thomas G O Riordan. State of the Art Mucociliary Clearance in the Airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154 :1868–1902, 1996. ISSN 1073449X. doi : 10.1164/ajrccm.154.6.8970383.
- T Weiss, P Dorow, and R Felix. Regional mucociliary removal of inhaled particles in smokers with small airways disease. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 44(5) :338–45, January 1983. ISSN 0025-7931. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6622852>.
- S L Winters and D B Yeates. Roles of hydration, sodium, and chloride in regulation of canine mucociliary transport system. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 83(4) :1360–1369, 1997. ISSN 8750-7587.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- R E Wood, A Wanner, J Hirsch, and P M Farrell. Tracheal mucociliary transport in patients with cystic fibrosis and its stimulation by terbutaline. *The American review of respiratory disease*, 111(6) :733–8, June 1975. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1137241>.
- R Wu, J Yankaskas, E Cheng, M R Knowles, and R Boucher. Growth and differentiation of human nasal epithelial cells in culture. Serum-free, hormone-supplemented medium and proteoglycan synthesis. *The American review of respiratory disease*, 132(2) :311–20, August 1985. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896079>.
- Shang-Zhong Xu, Fanning Zeng, Guylain Boulay, Christian Grimm, Christian Harteneck, and David J Beech. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate : a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *British journal of pharmacology*, 145(4) :405–414, 2005. ISSN 0007-1188. doi : 10.1038/sj.bjp.0706197.
- J Yager, T. Chen, and M. Dulfano. Measurement of frequency of ciliary beats of human respiratory epithelium. *Chest*, 73(5) :627–633, May 1978. ISSN 0012-3692. doi : 10.1378/chest.73.5.627. URL <http://www.chestjournal.org/cgi/doi/10.1378/chest.73.5.627>.
- J A Yager, H Ellman, and M J Dulfano. Human ciliary beat frequency at three levels of the tracheobronchial tree. *The American review of respiratory disease*, 121(4) :661–5, April 1980. ISSN 0003-0805. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7386979>.
- Asma Yaghi, Aisha Zaman, Gerard Cox, and Myrna B. Dolovich. Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Respiratory Medicine*, 106(8) :1139–1147, 2012. ISSN 09546111. doi : 10.1016/j.rmed.2012.04.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2012.04.001>.
- O Zagoory, a Braiman, L Gheber, and Z Priel. Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *American journal of physiology. Cell physiology*, 280(1) :C100–C109, 2001. ISSN 03636143.
- J. M. Zahm, D. Gaillard, F. Dupuit, J. Hinnrasky, D. Porteous, J. R. Dorin, and E. Puchelle. Early alterations in airway mucociliary clearance and inflamma-

tion of the lamina propria in CF mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 272(3) :C853–859, March 1997. URL <http://ajpcell.physiology.org/content/272/3/C853>.

Muhammad H Zaman, Linda M Trapani, Alisha L Sieminski, Drew Mackellar, Haiyan Gong, Roger D Kamm, Alan Wells, Douglas a Lauffenburger, and Paul Matsudaira. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29) :10889–10894, 2006. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0604460103.

S T Zwas, I Katz, B Belfer, G L Baum, and E Aharonson. Scintigraphic monitoring of mucociliary tracheo-bronchial clearance of technetium-99m macroaggregated albumin aerosol. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 28(2) :161–167, 1987. ISSN 0161-5505.