HAL
open science

Caractérisation des mécanismes du battement ciliaire dans le cadre du transport mucociliaire normal et pathologique

Mathieu Bottier

To cite this version:

Mathieu Bottier. Caractérisation des mécanismes du battement ciliaire dans le cadre du transport mucociliaire normal et pathologique. Autre. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC1092 . tel-01553428

HAL Id: tel-01553428

https://theses.hal.science/tel-01553428v1

Submitted on 3 Jul 2017

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-EST

ÉCOLE DOCTORALE UNIVERSITÉ PARIS-EST
Sciences, Ingénierie et Environnement

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris-Est

Spécialité : Sciences de l'ingénieur

Présentée et soutenue par

Mathieu Bottier

Caractérisation des mécanismes du battement ciliaire dans le cadre du transport mucociliaire normal et pathologique

Thèse soutenue le 30 novembre 2016 devant le jury composé de :

Annie Viallat	Directrice de Recherche CNRS Université de Aix-Marseille	(Rapporteur)
François Gallet	Professeur des Universités Université Paris 7 - Diderot	(Rapporteur)
Vincent Fleury	Directeur de Recherche CNRS Université Paris 7 - Diderot	(Examinateur)
Bernard Maitre	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier Université Paris-Est Créteil	(Examinateur)
Bruno Louis	Chargé de Recherche Inserm Université Paris-Est Créteil	(Directeur de thèse)
Marcel Filoche	Directeur de Recherche CNRS Ecole Polytechnique, Palaiseau	(Co-encadrant de thèse)
Jean-François Papon	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier Université Paris Sud, Kremlin-Bicêtre	(Co-encadrant de thèse)

Institut Mondor de Recherche Biomédicale
Inserm U955 Eq 13 - CNRS ERL 7240
Biomécanique et appareil respiratoire : une approche multi-échelles
Faculté de médecine, Créteil

Inserm

IMRB INSTITUT MONDOR DE RECHERCHE BIOMÉDICALE

cnrs INSIS

Remerciements

Je remercie Annie Viallat et Françoise Gallet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail, et pour le temps qu'ils y ont consacré. Je remercie Vincent Fleury et Bernard Maitre d'avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse.

Je remercie l'institut des sciences de l'ingénierie et des systèmes (INSIS) du CNRS de m'avoir accordé une bourse d'ingénieur doctorant me permettant de mener ce travail pendant 3 ans.

Je remercie Bruno Louis de m'avoir permis de faire ma thèse sur ce sujet passionnant qu'est le battement ciliaire et d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Je le remercie également d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions, de m'avoir motivé, fait confiance et expliqué ce qu'était le travail de chercheur. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait découvrir mon sujet et le laboratoire. Ces années passées à ses côtés resteront un très bon souvenir. Elles m'ont permis de grandir dans ma vie personnelle et professionnelle.

Je remercie Marcel Filoche de m'avoir appris la modélisation numérique, d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions. Je le remercie également de son aide précieuse dans la rédaction des équations et pour ses conseils concernant ma vie professionnelle future.

Je remercie Jean François Papon de son accompagnement et de ses réponses sur le côté clinique de ma thèse, pour sa présence à mes côtés aux différents congrès médicaux et pour les brossages nasaux qu'il a prélevés non parfois sans mal. Merci également pour son travail sur le battement ciliaire et la DCP qui m'ont permis d'avoir des références solides sur lesquelles m'appuyer durant ma thèse.

Je remercie Daniel Isabey de m'avoir accueilli dans son équipe dans le cadre de mon Master 2 et de ma thèse, pour sa pédagogie, sa rigueur et son attachement communicatif au chocolat.

Je remercie Gabriel Pelle de sa pédagogie et de ses nombreux conseils sur le déroulement de la thèse et la vie du chercheur. Un grand merci également pour la relecture de ce manuscrit.

Je remercie Estelle Escudier de ses conseils toujours avisés et de son expertise pointue concernant la culture de cellules épithéliales et les dyskinésies ciliaires. Je remercie également Emilie Béquignon et André Coste pour leurs conseils et le temps qu'ils m'ont consacré, notamment pour les brossages et au bloc opératoire pour le prélèvement de polypes. C'est grâce à votre travail que j'ai pu mener à bien les cultures.

Je remercie Sylvain Blanchon de sa collaboration pour l'analyse du battement ciliaire des patients DCP et pour sa bonne humeur.

Je remercie Ngoc-Minh "Minh" Nguyen de son aide et de sa patience pour l'utilisation de l'AFM et pour toutes les bonnes choses qu'il nous a ramenées du Vietnam.

Je remercie James "Jim" Grotberg de tous ses conseils concernant la modélisation et pour son cours de mécanique des bio-fluides. Son aide m'a été très précieuse.

Je remercie Christelle Angely, Sofia André Dias, Marta Pena Fernandez, Sarah Bourass et tous les autres étudiants avec lesquels j'ai pu avoir des discussions plus ou moins scientifiques. Votre bonne humeur a toujours permis d'avoir une ambiance très agréable dans notre bureau.

Je remercie l'équipe de Serge Amselem de l'hôpital Trousseau, notamment Marie Legendre et Ludovic Jeanson, qui m'ont permis d'avoir accès au matériel nécessaire quand j'en avais besoin et pour toutes leurs réponses concernant la génétique des dyskinésies.

Je remercie Gilbert Desmarais de sa sagesse et sa passion communicative pour l'enseignement et l'électronique. Je remercie Patricia Zadigue de m'avoir formé à la culture et pour sa patience. Je remercie Françoise Zerah de ses conseils précieux sur les statistiques.

Je remercie les patients d'avoir accepté de participer à cette étude me permettant de travailler sur ce sujet.

Je remercie la Fondation de la Recherche Médicale pour les financements qu'elle a accordés à l'équipe, notamment dans le cadre de l'étude clinique I-IsBaCc à laquelle j'ai modestement participé.

Je remercie les membres de la Cost Action Beat-PCD de leur accueil et pour les différents prix que j'ai pu recevoir lors des congrès.

Je remercie l'ensemble de l'équipe 13 avec qui j'ai passé plus de 3 ans, pour la gentillesse, l'accueil et l'amitié qui a été la leur. Je garderai un souvenir impérissable de ses moments à leurs côtés.

Je remercie également ma famille, notamment mes parents Brigitte et Daniel Bottier d'avoir cru en moi durant toutes ces années, de m'avoir poussé à aller toujours plus loin. Je remercie mon frère Guillaume Bottier de son soutien ; notamment sur le plan sportif. Je remercie tous mes amis que je ne pourrais énumérer ici, de leur soutien et de leur amitié durant toutes ces années. Puisse cette amitié durer encore longtemps. Une pensée toute particulière pour Paul et Alban, mes camarades de la promotion Hounsfield, qui eux-aussi ont choisi de poursuivre leurs études en doctorat.

La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de l'entreprise scientifique. Si ce qu'on va trouver est vraiment nouveau, alors c'est par définition quelque chose d'inconnu à l'avance.

François Jacob

Table des matières

Table des matières 1

Principales abréviations 4

Principaux paramètres et notations 4

1 Introduction 6

2 Rappels bibliographiques 8

2.1 Épuration mucociliaire 8

2.2 Battement ciliaire 9

2.3 Structure interne du cil mobile 10

2.4 Dyskinésies Ciliaires Primitives 12

2.4.1 Description Clinique 12

2.4.2 Anomalies de l'ultrastructure de l'axonème en microscopie électronique . 12

2.5 Évaluation du battement ciliaire et du transport mucociliaire 13

2.6 Évaluation de la force exercée par les cils 14

2.7 Modélisation biomécanique du transport mucociliaire 16

I Etude expérimentale de l'évaluation du battement ciliaire

3 Matériaux biologiques 17

3.1 Brossages nasaux 17

3.1.1 Protocole de prélèvement 18

3.1.2 Patients inclus dans l'étude des brossages nasaux 18

3.2 Culture primaire de cellules épithéliales nasales 19

3.2.1 Protocole de culture 19

3.2.2 Difficultés et mise au point 21

3.2.3 Patients inclus dans l'étude sur les cultures de CENH 21

4 Matériels et Méthodes de l'évaluation du battement ciliaire 22

4.1 Vidéo-microscopie à haute vitesse 22

4.1.1 Matériels 22

4.1.2 Mesure de la taille des pixels 23

4.1.3 Protocole expérimental pour l'enregistrement de films 24

4.2 Analyse du battement ciliaire 25
4.2.1 Evaluation semi-quantitative du battement ciliaire 25
4.2.2 Outils de mesure de la fréquence du battement ciliaire 25
4.2.3 Analyse cinématique du battement ciliaire 27
4.3 Nouveaux développements pour l'analyse du battement ciliaire 28
4.3.1 Longueur d'onde de l'onde métachrone 28
4.3.2 Densité relative de cils 29
4.3.3 Trajectoire de l'extrémité des cils 30
4.4 Evaluation de l'écoulement par le battement ciliaire par suivi de microbilles . . . 32
4.4.1 Protocole expérimental pour l'enregistrement des films de suivi de microbilles 32
4.4.2 Analyse post-enregistrement pour le suivi de microbilles 32
4.5 Mesure de force par microscopie à force atomique 35
4.5.1 Principe de la microscopie à force atomique (AFM) 36
4.5.2 Banc expérimental 37
4.5.3 Protocole expérimental pour l'évaluation de la force exercée par les cils . 37

5 Résultats et Discussion de l'évaluation du battement ciliaire 39
5.1 Patients et sélection des brossages nasaux 39
5.2 Influence des microbilles sur la fréquence de battement ciliaire 41
5.3 Paramètres du battement ciliaire 42
5.4 Ecoulement généré par le battement ciliaire 43
5.5 Relation entre la vitesse des microbilles et les paramètres du battement ciliaire . 44
5.6 Trajectoire de l'extrémité des cils 52
5.7 Cultures primaires de CENH 55
5.7.1 Nombre de cellules exploitables 55
5.7.2 Amélioration de la différenciation 55
5.8 Résultats préliminaires de l'évaluation de la force exercée par les cils en AFM . . 57
5.8.1 Analyse des signaux de déflexion 59
5.8.2 Extraction de la force générée par les cils 60
5.8.3 Estimation de la force générée par un cil 60

II Étude numérique

6 Modèle numérique 61
6.1 Du battement d'un cil individuel à l'onde métachrone 62
6.2 Calcul du champ de vitesses 65
6.3 Reformulation du problème en utilisant la fonction de courant 67
6.3.1 Développement asymptotique en ε de la fonction de courant 67
6.3.2 Premier ordre de la fonction de courant 68
6.3.3 Second ordre de la fonction de courant 70
6.4 Solution du champ de vitesses 74
6.5 Simulation du déplacement des microbilles 74

7 Résultats et discussion du modèle numérique **76**
7.1 Premier ordre du champ de vitesses 76
7.2 Second ordre du champ de vitesses 78
7.3 Champ de vitesses global 78
7.4 Trajectoire des microbilles 80
7.5 Vitesse des microbilles en fonction de la distance 80
7.5.1 Contribution des différents ordres de la vitesse du fluide sur la vitesse des microbilles. 81
7.5.2 Calcul de la valeur de la vitesse à la paroi ciliée (cas limite) 82
7.5.3 Effet de la variation des paramètres sur la vitesse des microbilles 83
7.5.4 Effets des paramètres de l'ellipse 85

III Comparaison entre l'évaluation du battement ciliaire expérimentale et les simulations numériques

8 Comparaison entre l'analyse du battement ciliaire et les résultats du modèle numerique **87**
8.1 Paramètres d'entrée du modèle numérique 87
8.1.1 Hauteur de fluide h 87
8.1.2 Longueur de glissement Φ 88
8.2 Comparaison de vitesses des microbilles expérimentales et simulées 90
8.3 Effets de la variation des paramètres du battement ciliaire sur l'efficacité du battement ciliaire 91

9 Index d'efficacité du battement ciliaire **92**
9.1 Construction de l'index 92
9.2 Application de l'index de l'efficacité du battement ciliaire aux patients DCP . . 96
9.3 Discussion de l'index 97

10 Conclusion **100**

Table des figures **102**

Liste des tableaux **105**

Bibliographie **106**

A Annexes **113**
A.1 Communications orales 113
A.2 Présentation de poster 114

Principales abréviations

2BD	: Anomalies des Bras de Dynéine internes et externes
ABC	: Amplitude du Battement Ciliaire
AFM	: Microscopie à force atomique (en anglais Atomic Force Microscopy)
BDE	: Anomalies des Bras de Dynéine Externes
BDI	: Anomalies des Bras de Dynéine Internes
CC	: Anomalies des Complexes Centraux
CENH	: Cellules Epithéliales Nasales Humaines
DCP	: Dyskinésies Ciliaires Primitives
FBC	: Fréquence du Battement Ciliaire
LOOM	: Longueur d'Onde de l'Onde Métachrone
nME	: Cils normaux en Microscopie Électronique
ORL	: Oto-Rhino-Laryngologie
VMHV	: Vidéo-Microscopie à Haute Vitesse

Principaux paramètres et notations

Paramètres

a	: 1/2 grand axe de l'ellipse
β	: excentricité de l'ellipse
βa	: 1/2 petit axe de l'ellipse
d_c	: distance entre deux cils
e_c	: diamètre du cils
ε	: 1/2 grand axe de l'ellipse (sans dimension)
f	: fréquence
f_c	: fraction d'aire libre entre les cils
h	: hauteur de la couche de fluide au dessus des cils
k	: nombre d'onde
$\lambda; \Lambda$	: longueur d'onde de l'onde métachrone dimensionnée et sans dimension
$L_b^*; L_b$	: distance microbille-cils moyenne dimensionnée et sans dimension
ω	: pulsation
Φ	: longueur de glissement
ρ_c	: desnité relative de cils
$t^*; t$	: temps dimensionné et sans dimension
τ_0^*	: contrainte de cisaillement simulée du mur cilié sur le fluide
τ_w^*	: contrainte de cisaillement du mur cilié sur le fluide
θ	: variable réduite rendant compte de la périodicité de l'onde métachrone

u, v	: composantes horizontale et verticale de la vitesse du fluide
$U_b^*; U_b$	: vitesse moyenne d'une microbille dimensionnée et sans dimension
U_0^*	: vitesse des microbilles simulée à la paroi ciliaire
U_w^*	: vitesse des microbilles mesurée à la paroi ciliaire
u_w, v_w	: composantes horizontale et verticale de la vitesse du mur
ψ	: fonction de courant
$\xi^*; \xi$	: abscisse du centre de l'ellipse dimensionnée et sans dimension
$X_w^*, Y_w^*; X_w, Y_w$	: positions de la pointe du cil dimensionnées et sans dimension
γ_1, A_1, B_1	: coefficients utilisés pour définir le premier ordre du champ de vitesses
A_2, B_2, C_2, G_n, C	: coefficients utilisés pour définir le second ordre du champ de vitesses

Notations

F_x, F_y	: dérivé partielle en x et en y de la fonction F
F'	: dérivé de la fonction F
F_1, F_2	: premier et second ordre de la fonction F
Re, Im	: partie réelle et imaginaire d'un nombre complexe
c.c.	: complexe conjugué d'un nombre complexe
$\bar{A}_1$	: complexe conjugué de A_1
Δ	: opérateur laplacien
i	: nombre complexe ($i^2 = -1$)
F^s	: contribution constante de F (s pour *steady* en anglais)

1 | Introduction

L'épuration mucociliaire est la première ligne de défense de l'appareil respiratoire [Wolff, 1986]. C'est une fonction fondamentale des voies aériennes qui repose essentiellement sur 3 composantes [Davis and Lazarowski, 2008]. La première composante est le mucus qui a la double propriété de piéger les aérocontaminants tout en limitant ou en éradiquant la prolifération microbiologique via un arsenal d'agents antibactériens [Knowles and Boucher, 2002]. La deuxième composante est formée par le battement synchronisé des cils situés à la surface des cellules de l'épithélium respiratoire. C'est ce battement qui assure le transport du mucus en direction du système digestif où il sera éliminé avec les aérocontaminants qu'il contient [Fahy and Dickey, 2010]. Enfin, la troisième composante est un système de transport ionique au niveau de l'épithélium permettant de conserver un environnement aqueux adéquat à la surface des voies aériennes.

L'altération de l'épuration mucociliaire (liée à une ou plusieures de ces composantes) se traduit par une stagnation et/ou une accumulation de mucus, conduisant potentiellement à des obstructions plus ou moins partielles avec modifications locales de l'écoulement, et à des infections chroniques des voies aériennes hautes et basses. On compte deux grands types d'altération de l'épuration mucociliaire. Le premier est lié aux caractéristiques du mucus, comme dans le cas de la mucoviscidose où le mucus est trop visqueux [Martiniano et al., 2014]. Le deuxième est lié à des anomalies de l'ultrastructure du cil et de son battement regroupées sous le terme de ciliopathies ou dyskinésies ciliaires [Fliegauf et al., 2007] qui peuvent être soit innées soit acquises.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre clinique de la problématique des ciliopathies respiratoires et de leur prise en charge. Les ciliopathies et leurs impacts fonctionnels sur l'épuration mucociliaire sont un problème multi-échelles qui va de la cellule à l'organe. Le battement hélicoïdal du cil représente l'échelle cellulaire alors que l'échelle tissulaire sera représentée par la coordination entre les cils individuels. Enfin, le transport du mucus le long des voies aériennes, qui permet l'épuration mucocilaire, représente le niveau de l'organe. Celui ci peut voir son efficacité modifié par des conditions macroscopiques telles que l'exposition à différentes agressions (mécaniques, chimiques, bactériennes,...). Dans le champ clinique, les ciliopathies ont surtout été abordées dans le cadre des maladies génétiques avec les dyskinésies ciliaires primitives (DCP), première ciliopathie identifiée [Afzelius, 1976] et deuxième plus fréquente affection congénitale des voies respiratoires après la mucoviscidose. Néanmoins les ciliopathies concernent aussi des pathologies beaucoup plus courantes comme la broncho-pneumopathie chronique obstructive [Yaghi et al., 2012] ou encore les rhinosinusites chroniques. Les infections respiratoires, notamment virales, sont les causes les

plus fréquentes d'agressions à l'origine des dyskinésies ciliaires acquises [Chilvers et al., 2001]. Les anomalies de l'épuration peuvent également provenir d'altérations liées à l'environnement (asthme [Thomas et al., 2010], tabagisme [Leopold et al., 2009],...). Les ciliopathies respiratoires représentent donc un réel problème de santé publique.

D'une manière générale, les fonctions des cils, qui sont en interaction étroite et permanente avec le milieu intracellulaire structuré par le cytosquelette et avec l'environnement externe (couches de fluides statiques ou en mouvement, cellules en interaction ...), dépendent de nombreux facteurs biomécaniques qui restent à identifier.
De plus, en l'état actuel des connaissances l'observation *in situ* du battement ciliaire et du transport mucociliaire est quasiment impossible chez les patients. Les cliniciens sont en demande de méthodes fiables, aussi faiblement invasives que possible et ne requérant que peu de coopération de la part du patient permettant d'évaluer le battement ciliaire et le transport mucociliaire. Ce besoin est particulièrement criant dans les cas "médians" où il subsiste un battement plus ou moins partiel (en absence de tout battement il est clair qu'il n'est nul besoin de méthodes sophistiquées pour déduire que l'épuration mucociliaire sera altérée).

L'objectif de ce projet, qui a été soutenu par l'Institut des sciences de l'ingénierie et des systèmes du CNRS (bourse ingénieur doctorant), est donc de mieux caractériser, à partir des outils de la Biomécanique, les mécanismes du battement ciliaire (sa cinématique comme les forces exercées) dans le cadre du transport mucociliaire normal et pathologique et à transférer ces connaissances au profit de la clinique.

Pour cela j'ai :

1. développé une méthodologie de caractérisation systématique de la mécanique ciliaire à partir de prélèvements biologiques issus de patients :
   a. mesure cinématique du battement ciliaire par vidéo-microscopie à haute vitesse,
   b. mesure du transport généré par les cils via un suivi de microbilles,
   c. mesure des forces générées par les cils par microscopie à force atomique.
2. proposé un modèle numérique intégrant le couplage entre battement ciliaire et transport de fluide. Ce modèle basé sur une approche "enveloppe" de l'ensemble des cils permet de simuler les mesures *in vivo ex situ*.
3. comparé mesures expérimentales et simulations numériques et proposé un nouvel index pour caractériser l'efficacité du battement ciliaire en termes de transport. Cet index présente l'avantage de ne pas exiger de modification de la pratique clinique concernant la collecte de données biologiques. Une première application numérique de cet index est également proposée à partir de données de patients atteints de dyskinésies ciliaires primitives.

2 | Rappels bibliographiques

Pour appréhender les ciliopathies respiratoires, je vais dans un premier temps faire un rappel sur la physiologie fonctionnelle de l'épuration mucociliaire, du battement ciliaire associé, en allant jusqu'à la structure interne du cil. Je vais ensuite décrire plus spécifiquement un ensemble de ciliopathies associées à un défaut de structure, les dyskinésies ciliaires primitives (DCP). (Le Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil est l'un des centres de références des maladies respiratoires rares (RespiRare) qui prend en charge l'ensemble des pathologies respiratoires rares de l'enfant dont les DCP. C'est pourquoi, nous nous intéressons à ces pathologies.) Dans une dernière partie, je vais m'attacher à décrire les travaux déjà effectués pour évaluer l'épuration mucociliaire et le battement ciliaire, ceux permettant de caractériser les forces exercées par les cils et je terminerai par un rappel des travaux sur la modélisation du transport mucociliaire.

2.1 Épuration mucociliaire

L'épuration mucociliaire - assurée par le transport mucociliaire - permet d'acheminer les aéro-contaminants en direction du système digestif. Ce transport, schématisé en figure 2.1, est donc bidirectionnel : descendant au niveau des voies aériennes nasales et montant au niveau des voies aériennes sous-pharyngées (trachée, bronches). Cette épuration permet d'éliminer les particules de plus de 10 µm.

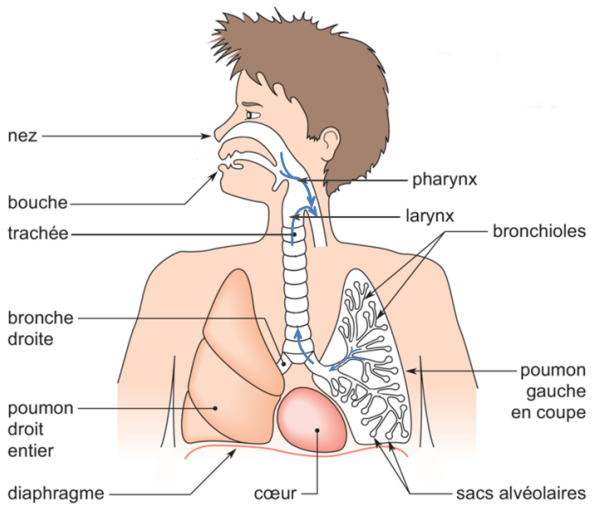


FIGURE 2.1 – **Schéma des voies aériennes**. Les flèches bleues indiquent le sens de circulation du transport mucociliaire.

L'épuration mucociliaire est rendue possible par l'organisation de l'épithélium des voies aériennes. Cet épithélium hautement spécialisé comporte une face basale en contact avec les tissus et une face apicale dans la lumière des voies aériennes. Il se compose de deux principaux types cellulaires : d'une part, les cellules caliciformes qui sécrètent le mucus, et d'autre part, les cellules ciliées qui assurent la propulsion du mucus (Fig. 2.2). Ces deux types de cellules sont présents dans les voies aériennes, du nez aux bronchioles terminales dans des proportions qui varient en fonction de la position dans l'arbre aérien.
Le transport mucociliaire est assuré par le battement des cils présents à la surface apicale des cellules ciliées. Chacune d'elles possède environ 200 cils avec une densité d'environ 5 à 8 cils par μm^2 [Sleigh et al., 1988, Hill et al., 2010]. Le battement des cils mobiles respiratoires s'effectue principalement dans la sous couche du liquide épithélial de surface. Ce dernier se compose de deux couches [Wanner et al., 1996] : une couche supérieure de mucus très visqueuse et non-Newtonienne composée à 98% d'eau sécrétée par les cellules spécialisées et une couche inférieure lubrificatrice, hydrique et peu visqueuse nommée "liquide péri-ciliaire" [Widdicombe and Widdicombe, 1995].

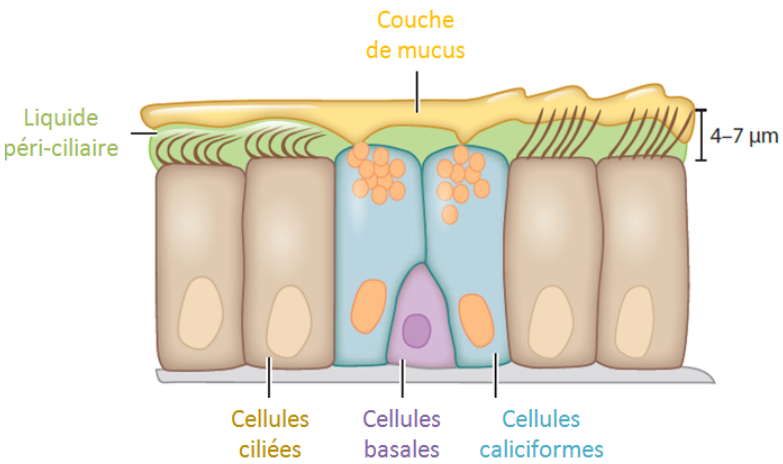
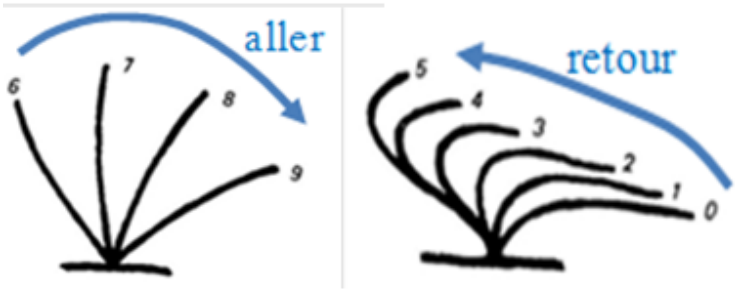


FIGURE 2.2 – **Schéma de l'épithélium respiratoire**. Modifié d'après Tilley,*et al.*, 2014

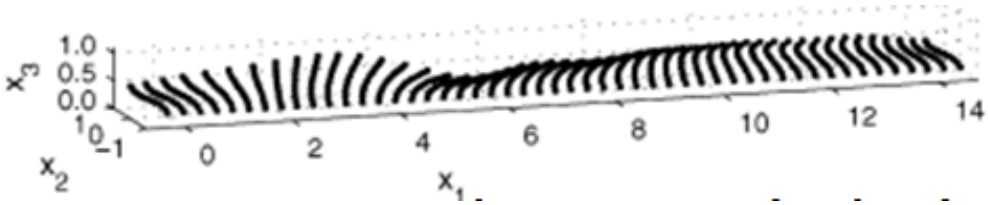
2.2 Battement ciliaire

Le battement ciliaire est un mouvement asymétrique permanent et périodique dans les 3 dimensions de l'espace qui priviligie néanmoins un plan principal de battement avec un angle d'écart avec ce plan inférieur à 5° [Chilvers and O'Callaghan, 2000]. Il se décompose en un mouvement aller (dit "battement actif") et retour (dit "battement passif") séparés par des temps de pause (Fig. 2.3(a)). La propulsion du mucus a lieu pendant le battement actif lorsque les pointes ciliaires pénètrent dans la couche de mucus pour la pousser, créant ainsi un mouvement. Cette phase active est plus rapide que la phase retour. Chez le sujet sain, la vitesse de transport mucociliaire est de l'ordre de 1 mm/min dans la trachée [Salathe, 2007] et la fréquence de l'ensemble du battement (actif + passif + pauses) est comprise entre 10 et 15 Hz [Sanderson and Sleigh, 1981, Sleigh et al., 1988, Gheber and Priel, 1997].

Le battement des cils d'une cellule est synchronisé avec les cils avoisinants et ceux des cellules voisines [Sanderson and Sleigh, 1981] avec un décalage de phase qui s'accroit avec la distance. Ceci crée une onde métachrone (Fig. 2.3(b)) qui participe aussi au déplacement du mucus [Okamoto and Nakaka, 1994]. A ma connaissance, il n'existe pas de mesure de la longueur d'onde de l'onde métachrone (LOOM) chez l'homme. Nous retrouvons néanmoins dans la littérature quelques valeurs pour des modèles animaux. [Machemer, 1972] a mesuré, par technique photographique, une LOOM de "7 unités de cils", soit entre 12 et 14 µm chez la *paramécie*. Sur ce même modèle, [Okamoto and Nakaka, 1994] ont décrit une LOOM de 11 µm en vidéo-microscopie. [Sanderson and Sleigh, 1981] ont observé une LOOM moyenne de 20 µm pouvant couvrir jusqu'à 2 à 4 cellules sur de la trachée de lapin. Enfin, [Gheber and Priel, 1994] ont mesuré par mesure optique une LOOM de 5 à 9 µm sur de l'œsophage de grenouille.



(a) Schématisation 2D de la phase active (aller) et passive (retour) du battement ciliaire (modifé d'après [Sanderson and Sleigh, 1981])



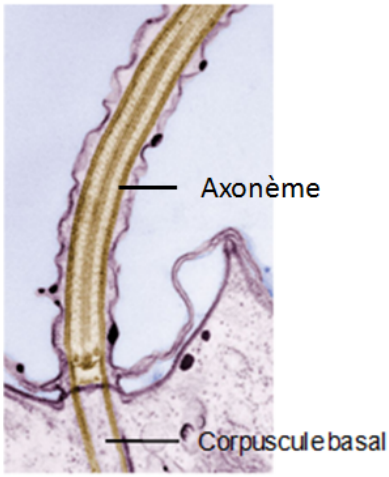
(b) Schématisation de l'onde métachrone (d'après [Fulford and Blake, 1986])

FIGURE 2.3 – **Caractéristiques du battement ciliaire**.

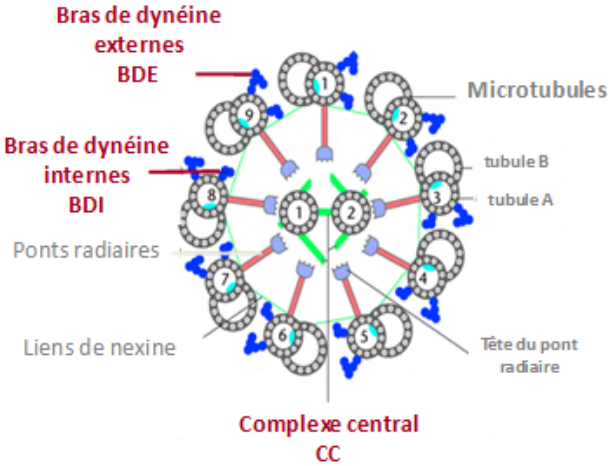
2.3 Structure interne du cil mobile

La forme et les caractéristiques du battement sont régulés par les différents éléments de l'ultrastructure du cil [Mitran, 2007, Satir and Christensen, 2007]. Les cils sont des extensions cellulaires naissant à partir d'un corpuscule basal (Fig. 2.4(a)). Ces cils mesurent environ 6 µm de long et 0,2 µm de diamètre. Chaque cil contient du cytoplasme et un réseau de microtubules organisé sur toute la longueur du cil en une structure interne appelée axonème (Fig. 2.4(b)). L'axonème des cils mobiles est composé selon un schéma dit en "9 + 2" microtubules. Un complexe central, formé de 2 microtubules circulaires contenus dans une même gaine, est entouré de 9 doublets de microtubules périphériques. Ces doublets sont constitués d'un microtubule complet

(tubule A) et d'un microtubule incomplet (tubule B) fusionné sur une partie de la circonférence du microtubule (A). Des bras de dynéine internes (situés du côté de la paire centrale) et externes (situés du côté de la membrane ciliaire) sont accrochés deux par deux aux microtubules A des doublets périphériques. Les bras de dynéines sont des complexes multiprotéiques qui portent l'activité ATPasique indispensable au mouvement du cil. Les bras internes sont répartis à intervalles réguliers tout le long du microtubule avec une périodicité en distance de 96 nm alors que les bras externes le sont avec une périodicité de 24 nm. Enfin des liens de nexine (lien élastique) relient les neuf doublets périphériques entre eux alors que des ponts radiaires relient les doublets périphériques au complexe central.



(a) Cil en coupe longitudinale observé en microscopie électronique à transmission (d'après Link,*et al.*, 2001)



(b) Schéma de l'axonème "9+2" en coupe transversale

FIGURE 2.4 – **Ultrastructure du cil mobile**.

L'alignement de la paire des microtubules centraux détermine le plan principal de battement. La fréquence du battement ciliaire serait régulée par les bras de dynéine externes. La forme du battement et la courbure du cil dépendraient (au moins en partie) des bras de dynéine internes. Les bras de dynéine sont des moteurs moléculaires, qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie, et dont l'activation tend à bloquer le glissement des doublets les uns sur les autres [Salathe, 2007]. Ce mouvement de glissement contrarié est alors converti en flexion. Cette activation est faite de manière asymétrique ce qui provoque le mouvement de l'ensemble de l'axonème [Braiman and Priel, 2008]. Les ponts radiaires relayeraient des signaux depuis le complexe central jusqu'au bras de dynéine pour en contrôler l'activité. En particulier, ils seraient susceptibles de mesurer la tension ou la torsion de l'axonème lors du mouvement. Un altération de cette ultrastructure, qu'elle soit acquise ou innée, peut donc entrainer une modification du battement ciliaire voir son arrêt avec comme conséquence potentielle un défaut de l'épuration mucociliaire.

2.4 Dyskinésies Ciliaires Primitives

2.4.1 Description Clinique

Les dyskinésies ciliaires primitives forment un groupe de maladies génétiques rares, classiquement transmises selon un mode autosomique récessif avec une prévalence estimée à 1 sur 20000 naissances. Généralement, elles se caractérisent par une anomalie de l'ultrastructure de l'axonème qui génère un défaut du battement et/ou de sa coordination entrainant un défaut de l'épuration mucociliaire conduisant à des infections respiratoires récidivantes se manifestant classiquement dès les premières années de vie [Bush et al., 2007]. Ces infections se traduisent par des broncho-pneumopathies et des rhinosinusites chroniques évoluant respectivement vers une dilatation des bronches et une polypose naso-sinusienne. L'atteinte respiratoire des patients atteints de DCP est moins sévère que celles des patients atteints de mucoviscidose. Néanmoins, un certain nombre de patients présentent une colonisation à bacille pyocyanique entrainant une diminution notable de la fonction respiratoire. La fonction pulmonaire de la majorité des enfants atteints de DCP reste stable lorsqu'un traitement efficace est établi précocement [Ellermand and Bisgaard, 1997, Knowles et al., 2013]. La plupart des hommes présentent une infertilité par asthénospermie en lien avec une anomalie du flagelle du spermatozoïde similaire à celle présente au niveau des cils respiratoires [Afzelius, 1985, Escudier et al., 2006]. Une hypofertilité féminine, secondaire aux anomalies des cils des trompes de Fallope, peut également exister. Au cours du développement embryonnaire, le défaut de mobilité ciliaire entraine une latéralisation aléatoire des organes : environ la moitié des patients présentent une rotation inverse des viscères (*situs inversus*) correspondant alors au syndrome de Kartagener [Kartagener, 1933].

2.4.2 Anomalies de l'ultrastructure de l'axonème en microscopie électronique

La première anomalie ciliaire décrite, qui s'avère être aussi la plus fréquente, retrouvée chez les patients atteints de DCP, correspond à une absence des bras externes de dynéines [Afzelius, 1976]. De nombreuses autres anomalies ultrastructurales ont ensuite été décrites dans le cadre des DCP [Afzelius, 1985]. Les bras de dynéines sont le plus souvent concernés avec, selon les études, une absence isolée des bras externes (24 à 43%) ou associée à une absence des bras internes (24 à 45 %), ou une absence des bras internes de dynéines associée à une désorganisation axonémale (14 à 29%). Les anomalies du complexe central sont plus rares (4 à 18%) [Mitchison and Mitchison, 2010, Papon et al., 2010]. Les anomalies des bras de dynéines concernent en général la totalité des cils alors qu'il persiste toujours des cils normaux en cas d'anomalies du complexe central. Enfin, dans un certain nombre de cas (10 à 20%), aucune anomalie ultrastructurale n'est identifiée chez des patients atteints de DCP [Papon et al., 2010]. La description de l'ultrastructure du cil permet de caractériser les DCP mais ne permet pas de connaitre l'impact direct sur le transport mucociliaire. C'est pourquoi les cliniciens sont en demande de méthodes d'évaluation du battement ciliaire et du transport associé.

2.5 Évaluation du battement ciliaire et du transport mucociliaire

Dans le passé, diverses méthodes d'évaluations intégrées du transport mucociliaire ont été proposées et utilisées avant d'être plus ou moins abandonnées : on peut citer le test de la saccharine [Braat et al., 1995, Canciani et al., 1988] consistant à déposer un peu de cette substance à l'entrée des voies aériennes nasales et à mesurer le temps nécessaire à la perception du goût sucré (temps nécessaire pour transporter la saccharine de l'entrée du nez jusqu'à l'arrière gorge). De manière similaire, il a été proposé de mesurer le temps de parcours de marqueurs [Schipper et al., 1991] comme des gouttes de colorants [van de Donk et al., 1982] ou encore des particules de charbon [Passàli et al., 1984] entre l'entrée des voies aériennes et le fond de la gorge. Ces tests ont été abandonnés par les cliniciens dans la mesure où ils se sont révélés peu reproductibles, peu spécifiques et nécessitant une parfaite coopération du patient (immobilisation sur un long moment, absence de toux ou de reniflement,...) et de ce fait quasiment impraticables chez des enfants moins de 12 ans [Barbato et al., 2009]. Par la suite, des techniques de suivi du transport de radio isotopes, albumine marquée ou ^{99m}Technicium, dans le nez des patients ont été proposés [Yeates et al., 1981, Del Donno et al., 1988, Mortensen, 1998, Munkholm et al., 2015]. Malgré une bonne sensibilité (de l'ordre de 95%) pour le diagnostic de la DCP, une faible spécificité (55%) réduit l'intérêt de ce type de techniques pour le diagnostic [De Boeck et al., 2005]. Plus récemment, des techniques de tomographie par cohérence optique permettant une étude globale du transport mucociliaire ont été proposé [Liu et al., 2013]. Cependant, à cause des diverses exigences de ces techniques (radiations,...), ces différentes méthodes sont très rarement utilisées dans la pratique clinique et ne sont d'ailleurs plus recommandées pour le diagnostic chez l'enfant par les spécialistes de réference (task force pour le diagnostic de la DCP).

L'observation microscopique des cellules ciliées obtenues par brossages nasaux ou bronchiques reste la méthode la plus commune pour l'évaluation du battement ciliaire. Pendant très longtemps, le seul paramètre issu de cette observation microscopique a été la fréquence du battement ciliaire (FBC). Celle-ci est déterminée par diverses techniques consistant au couplage d'un microscope soit avec un stroboscope électronique [Escudier et al., 1984], soit avec un photo-oscillomètre ou un photomultiplicateur [Rutland and Cole, 1980] soit enfin avec une caméra à haute vitesse [Gray, 1930, Dresdner and Wong, 1984]). Indépendamment des limites purement techniques (caractère observateur dépendant pour la stroboscopie, grande variabilité des résultats pour le photo-oscillomètre et le photomultiplicateur [Chilvers and O'Callaghan, 2000]) la fréquence du battement ciliaire (FBC) reste notoirement insuffisante pour faire un diagnostic. En effet, il existe des formes de DCP associant une fréquence normale, voire légèrement supérieure, à un mouvement ciliaire anormal [Stannard et al., 2010]. Le couplage de la microscopie avec une caméra numérique à haute vitesse encore appelé Vidéo-Microscopie à Haute Vitesse (VMHV), utilisé pour la première fois en 1984 sur un épithélium de palais de grenouille [Dresdner and Wong, 1984], a constitué une petite révolution pour l'évaluation du battement ciliaire. La possibilité de ralentir

le mouvement voire d'analyser celui-ci image par image associée à la possibilité de visionnages multiples se sont révélées être des atouts fondamentaux pour obtenir une description beaucoup plus fine du battement ciliaire avec en particulier l'évaluation de la forme du mouvement des cils. En 2000, [Chilvers and O'Callaghan, 2000] a montré l'intérêt de cette technique par rapport aux autres techniques classiques pour le diagnostic de la DCP. La VMHV est désormais courament utilisée [Papon et al., 2012, Amirav et al., 2015, Quinn et al., 2015, Jackson et al., 2016]. Néanmoins ces différentes études se focalisent soit sur le battement d'un cil [Papon et al., 2012] avec la description de paramètres quantifiés : amplitude, distance parcourue par la pointe du cil,... (voir plus de détail en §4.2.3), soit sur la forme du battement ciliaire [Amirav et al., 2015, Quinn et al., 2015, Jackson et al., 2016] sans donner d'information directe sur l'efficacité globale du battement ciliaire dans le cadre du transport mucociliaire.

2.6 Évaluation de la force exercée par les cils

La mécanique peut se caractériser comme l'interaction entre un déplacement et une force. Nous avons vu différentes méthodes pour évaluer de façon plus ou moins précise, le déplacement de la pointe du cil, on peut donc également se poser à la question d'évaluer la force générée par le battement ciliaire. Cette évaluation de la force générée par les cils a rarement été abordée dans la littérature. En 1960, [Yoneda, 1960] a proposé une technique d'évaluation de la force exercée par un cil de moule commune (*Mytilius Edulis*). La moule commune présente l'avantage d'avoir des cils assez imposants par rapport aux cils respiratoires (de l'ordre de 50 µm) et relativement bien séparés les uns des autres ce qui permet une identification "facile" de chaque cil. En quelques mots, la technique était basée sur l'utilisation d'une micro-aiguille de verre, dont le coefficient d'élasticité est connu, placée au contact du cil. Lorsque l'aiguille bloque le cil, il se produit une période d'arrêt pendant laquelle le cil continue à exercer une force constante sur la pointe de l'aiguille. Cette force, appelée "force d'arrêt" par Yoneda, est égale et opposée à la force nécessaire au déplacement de la pointe de l'aiguille. Les auteurs ont trouvé que cette force variait de 500 à 3000 pN. La plupart des études suivantes reprenant cette technique, seront effectuées sur le flagelle de spermatozoïde. Si le mouvement du flagelle de spermatozoïde est éloigné du battement ciliaire, sa structure interne reste extrêmement proche de celle des cils respiratoires. Avec cette technique d'aiguille, [Tani and Kamimura, 1999] ont décrit une force de 100 à 250 pN sur un spermatozoïde d'oursin plat (*Clypeaster japonicus*) et [Schmitz et al., 2000], une force de 250 ± 90 pN sur un spermatozoïde de taureau. Pinces optiques [König et al., 1996] et microscopie à force atomique [Sakakibara et al., 2004] furent aussi utilisés pour évaluer la force exercée par le flagelle : [König et al., 1996] ont évalué la force intrinsèque d'un flagelle à 44 ± 20 pN par flagelle et [Sakakibara et al., 2004] ont décrit une force pouvant aller jusqu'à 500 pN pour un flagelle de spermatozoïde d'oursin (*Hemicentrotus pulcherrimus*).

Il faudra attendre 2007 pour que des cils relativement plus proches des cils respiratoires soient évalués. [Teff et al., 2007] utilisant de l'œsophage de grenouille (*Rana ridibunda*) mis en culture mono-couche ont mesuré une force de 210 ± 80 pN par cil.

Finalement, [Hill et al., 2010] qui possèdent un modèle de culture d'épithélium bronchique en interface air liquide (proche du modèle de culture décrit en §3.2) ont mesuré la force des cils mobiles respiratoires grâce à une technique originale de pince magnétique. Des microbilles magnétiques de 2,8 µm de diamètre sont fixées à la pointe des cils et un microscope, dit à force 3D ("3DFM"), permet de mesurer les forces générées. Dans cette étude, la force générée par un cil est de 62 ± 18 pN.

L'ensemble de ces mesures est regroupé en figure 2.5. On peut observer, qu'en dehors de la première étude de [Yoneda, 1960], malgré des modèles différents et des techniques différentes, l'ensemble de ces résultats semblent être du même ordre de grandeur.

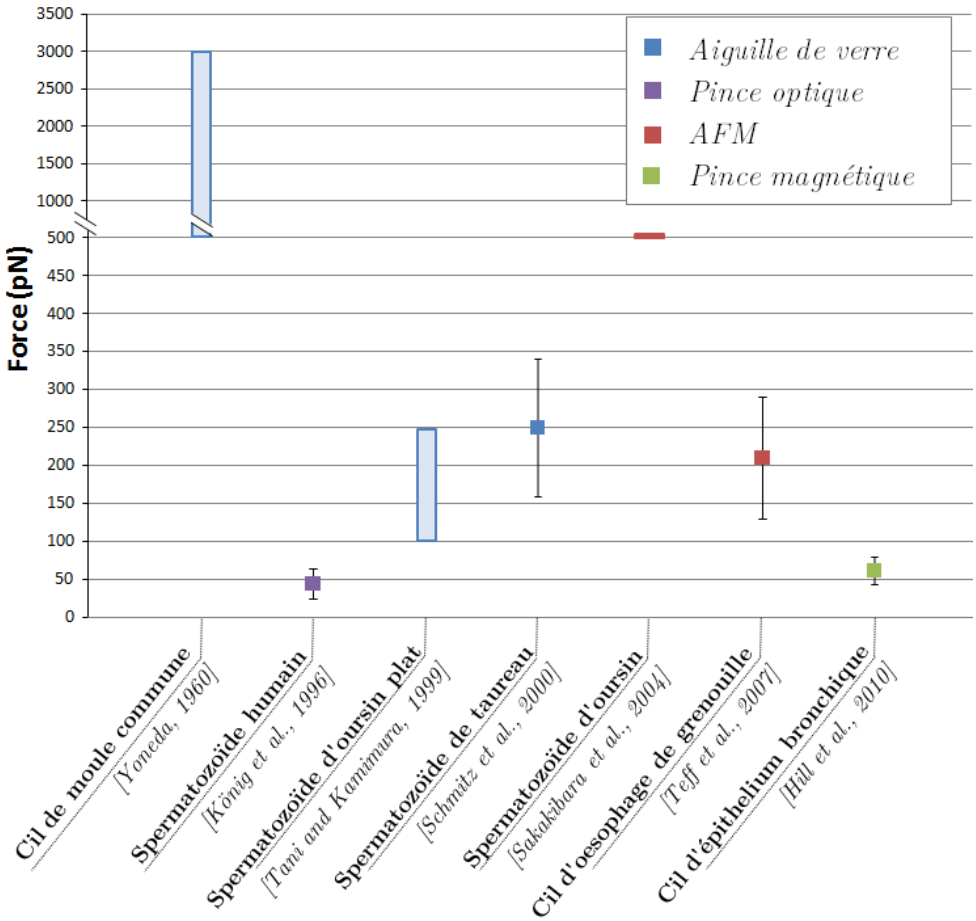


FIGURE 2.5 – **Figure récapitulative de la force exercée par les cils (ou flagelles)**. Les techniques utilisées sont indiquées en légende par le code couleur. Le modèle expérimental et la référence sont indiqués sur l'axe horizontale. Le carré, lorsqu'il est présent, représente la valeur moyenne. Les barres d'erreur, lorsqu'elles sont présentes, représentent l'écart-type. La boite, lorsqu'elle est présente, représente la plage d'observation (minimum - maximum). La barre horizontale, lorsqu'elle est présente, indique que nous ne connaissons que la valeur maximale. L'échelle horizontale n'est pas linéaire, la double séparation parallèle indique un changement d'unité.

2.7 Modélisation biomécanique du transport mucociliaire

Dans la littérature biophysique ou biomécanique, deux grands types de modèles du battement ciliaire peuvent être trouvés : les modèles dits "*discrete-cilia*" (cils distincts) et les modèles dits "*volume-force*" (force-volume) [Smith et al., 2008].

Dans les modèles "*discrete-cilia*", chaque cil est modélisé comme une entité distincte et sa forme est paramétrée sur un cycle complet de battement [Blake, 1972, Fulford and Blake, 1986, Lauga and Powers, 2009]. Par ailleurs, ces modèles "*discrete-cilia*" sont divisés en deux types : "*prescribed beating* " et "*couple-internal mechanics/fluid-structure interaction*". Dans les modèles "*prescribed beating* " (battement prescrit), le battement ciliaire est imposé comme une entrée de la simulation et permet le calcul de vitesse du mucus en fonction de différentes conditions (FBC, viscosité du mucus) [Lee et al., 2011]. Dans les modèles "*couple-internal mechanics/fluid-structure interaction*" (interaction couplée mécanique interne/fluide-structure), le battement ciliaire est crée par le couplage entre les forces internes du cils et les forces visqueuses externes [Mitran, 2007, Yang and Dillon, 2008].

En revanche, dans les modèles "*volume-force*", qui sont des modèles phénoménologiques, les cils sont modélisés par une distribution spatiale continue d'une force, variant dans le temps lorsque le cil bat [Keller, 1975, Blake and Winet, 1980, Smith et al., 2007]. Dans ce type de modèle, une approche de modélisation par envelope a l'avantage de permettre la formation d'une onde métachrone au niveau de la couche de cils [Childress, 1981]. Le battement ciliaire est simplifié en un "mur ondulé", qui se déforme avec le temps de manière périodique à une fréquence égale à la FBC. Ce mur couvre la couche de cils et le problème est traité en ignorant les détails de la dynamique qui règne sous cette couche [Ross and Corrsin, 1974, Velez-Cordero and Lauga, 2013].

On trouve aussi dans la littérature un certain nombre d'études qui se sont concentrées sur l'effet de la rhéologie du fluide (mucus) sur l'écoulement induit par les cils [Vasquez et al., 2016] ou par un mouvement ondulant tel que celui du flagelle [Shen and Arratia, 2011]. Que l'approche ait été expérimentale (avec par exemple l'utilisation d'une tige hélicoïdale [Liu et al., 2011] ou de cylindres imbriqués [Dasgupta et al., 2013]) ou bien qu'elle ait été numérique avec un modèle de mouvement ondulant [Lauga, 2007, Fu et al., 2009, Teran et al., 2010, Zhu et al., 2012] qui s'apparente à un modèle "par enveloppe", ces études ne correspondent pas à notre problématique des ciliopathies respiratoires qui ne sont pas liées à la viscosité du mucus.

Première partie

Etude expérimentale de l'évaluation du battement ciliaire

3 | Matériaux biologiques

Nos études expérimentales ont été effectuées sur des cellules épithéliales nasales humaines provenant de 2 origines : des cellules issues de brossages nasaux prélevées lors de consultations, et des cellules issues de culture de déchets chirurgicaux obtenues lors de polypectomies nasales.

3.1 Brossages nasaux

Les brossages nasaux constituent la première source de matériel biologique utilisé pendant cette thèse. Le laboratoire regroupe en effet des chirurgiens ORL travaillant notamment au sein des services de consultation du CHU Henri Mondor, de l'hôpital intercommunal de Créteil ou encore du CHU Kremlin-Bicêtre. Cette collaboration avec les services cliniques permet le recrutement de patients admis pour diverses maladies respiratoires, chroniques ou aigues, dont notamment des ciliopathies. Les brossages nasaux, réalisé en routine au sein de ces services permettent de recueillir des cellules ciliées qui seront ensuite analysées (Fig. 3.1). Nous avons privilégié les brossages nasaux aux brossages bronchiques car ils sont à la fois plus simples à réaliser et moins invasifs tout en restant aussi informatifs (au moins en ce qui concerne le diagnostic de la DCP [Papon et al., 2010]) que les prélèvements bronchiques qui nécessitent une endoscopie beaucoup plus profonde.

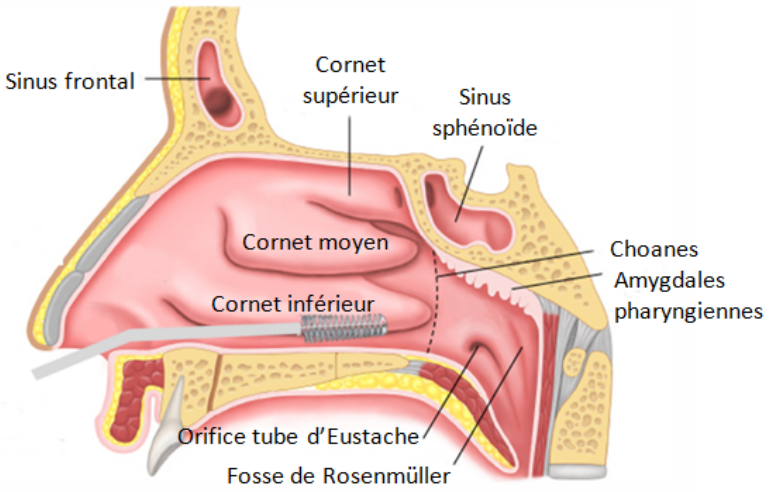


FIGURE 3.1 – **Principe du brossage nasal**. Les cellules sont prélevées au niveau du cornet inférieur à l'aide d'une brosse cytologique.

3.1.1 Protocole de prélèvement

Les brossages nasaux sont réalisés selon le protocole suivant (selon les recommandations de Respirare [1]) :

- Anesthésie locale + vasoconstriction : introduction sous contrôle rhinoscopique avec une pince de Politzer de cotonettes imbibées de xylocaïne 5% avec naphazoline (théoriquement contre-indiquée chez l'enfant de moins de 6 ans) bien essorées (afin d'éviter le ruissellement postérieur et donc l'anesthésie du pharynx très désagréable) qui sont laissées en place une dizaine de minutes.
- Prélèvement réalisé selon les habitudes sous guidage endoscopique (optique rigide 0° ou 30°) ou sous guidage microscopique chez les petits enfants (en dessous de 6-8 ans).
- Brossage de la muqueuse nasale à l'aide d'une brosse cytologique, préalablement humidifiée par immersion dans le milieu de recueil, en effectuant cinq à dix mouvements de rotation et de translation au niveau de la face médiale du tiers moyen (le tiers antérieur est revêtu d'un épithélium non cilié) du cornet inférieur (ou si besoin au niveau du cornet moyen lorsque le cornet inférieur est cicatriciel).
- La brosse est ensuite agitée vigoureusement dans un tube en polystyrène à fond conique stérile contenant environ 3 ml d'un milieu de survie cellulaire

La richesse cellulaire du prélèvement peut être grossièrement appréciée par observation de la suspension cellulaire avant sédimentation. En général, nous comptons environ 1 million de cellules par brossage. Le brossage nasal présente l'avantage de donner des cellules épithéliales nasales rapidement exploitables (par rapport à la culture cellulaire). Néanmoins, il faut noter que la survie cellulaire oblige à une utilisation rapide : survie d'environ 20 minutes sur la lame du microscope et utilisation recommandée dans les 6 heures après le prélèvement. Il est important de noter que les cellules obtenues, en suspension dans le milieu de conservation, sont libres de mucus.

3.1.2 Patients inclus dans l'étude des brossages nasaux

L'ensemble des patients inclus étaient adressés soit au centre de diagnostic de Créteil soit à celui du Kremlin-Bicêtre pour des infections chroniques des voies aériennes supérieures ou inférieures (bronchites et/ou dilatation des bronches et sinusites). Le consentement éclairé a été obtenu chez tous les patients après que cette étude ait été approuvée par le Comité de Protection des Personnes Ile de France XI (référence CPP 15038).

1. Centre de référence des maladies respiratoires rares, *disponible en ligne*

3.2 Culture primaire de cellules épithéliales nasales

Une autre source de matériel biologique disponible au sein du laboratoire est constituée par des cultures de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) obtenues après re-différenciation à partir de déchets chirurgicaux de polypectomies nasales. Ces CENH permettent théoriquement d'obtenir un modèle d'épithélium cilié [Gruenert et al., 1995, Papon et al., 2002].

3.2.1 Protocole de culture

Le modèle utilisé est une culture primaire de CENH en interface air-liquide (Fig. 3.2) comportant des cellules basales, ciliées et à mucus et présentant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles proches des conditions observées in vivo [Fulcher et al., 2005].

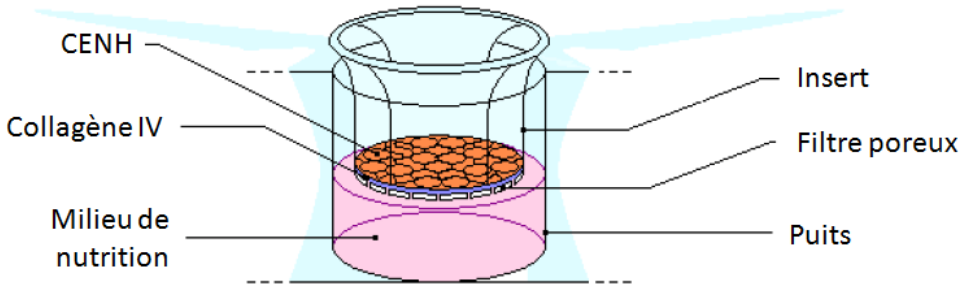


FIGURE 3.2 – **Schéma de la culture en interface air-liquide**. Le puits contient les CENH. Le milieu sous nageant permet la nutrition des cellules.

Après avoir transporté le prélèvement du bloc opératoire jusqu'au laboratoire, les cellules sont dissociés pour isoler les cellules basales. Ces cellules sont ensuite mises en culture pour être cultivées en interface air-liquide jusqu'à re-différenciation en épithélium respiratoire. Un milieu de culture dit "milieu de base" est utilisé tout le long de ces 5 étapes. Il est composé de :

- de DMEM, acronyme anglais pour Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies), qui est un milieu de culture classique pour le maintien et la nutrition de cellules.
- d'Ham's F12 (Life Technologies), qui est un autre milieu de culture classique pour la culture primaire
- d'antibiotiques : pénicilline, streptomycine, fungizone (Life Technologies) et gentamycine (Sigma)

DMEM et Ham's F12 sont mélangés à volume égal. Le protocole de culture est constitué de 5 étapes présentées ci dessous.

i. Transport du lieu de prélèvement au laboratoire Après résection chirurgicale, les polypes sont immédiatement placés à 4°C dans du milieu de transport (milieu de base avec une double dose d'antibiotiques). Les polypes sont ensuite rapidement transportés au laboratoire où les manipulations qui vont suivre se font sous hotte stérile dans un laboratoire de classe de confinement 2 (L2).

ii. Dissociation cellulaire Le milieu de transport est aspiré et les polypes sont débarrassés du mucus et des caillots sanguins par un rinçage dans un milieu tampon PBS (acronyme anglais pour phosphate buffered saline, Life Technologies) contenant du DTT (5nM ; dithiothréitol, Sigma), détergent capable d'éliminer le mucus. Une digestion enzymatique est ensuite réalisée en incubant les polypes pendant 18 heures à 4°C dans du milieu de base dans lequel est ajouté de la protéase (pronase 0,1% ; Sigma) qui permet une dégradation des protéines.

iii. Mise en culture Le milieu d'ensemencement est constitué de milieu de base contenant 5% de sérum de veau fœtal (Thermo Fisher Scientific) et des acides aminés non essentiels (Life Technologies). En fin d'incubation, la protéase est neutralisée volume à volume avec du milieu d'ensemencement. Les cellules dissociées sont récupérées par filtration puis centrifugation à 1500 tr/min pendant 7 minutes. Le surnageant est aspiré et le culot cellulaire est dissocié dans une solution de Trypsin-EDTA Solution 10X (Life technologies). La trypsine ensuite est neutralisée volume à volume par du milieu d'ensemencement. Les cellules sont centrifugées puis comptées sur une cellule de Malassez pour être enfin ensemencées sur des filtres de 1 cm^2 (pores de 0,4 µm) montés dans des inserts Transwell (Costar), placés chacun dans un puits aménagé sur une plaque de 12 puits. Chaque filtre a été recouvert au moins 24 heures avant l'ensemencement, d'une couche de collagène IV déposée par sédimentation (10 à 20 $\mu g.cm^{-2}$). L'ensemencement est réalisé dans chaque insert, en pipetant 1 ml de milieu d'ensemencement contenant environ 1 million de cellules par voie apicale (c'est-à-dire dans l'insert, sur le dessus du filtre). Le milieu de nutrition, composé de milieu de base additionné d'Ultroser-G (Pall France) à 2 %, un substitut au sérum de veau fœtal, est déposé au fond de chaque puits, au contact du pôle basal du filtre.

iv. Mise en interface Après 24 heures de culture des CENH en immersion, la mise en interface air-liquide est effectuée en aspirant le milieu d'ensemencement puis en lavant les cellules par voie apicale à 3 reprises avec du tampon PBS, afin d'éliminer les cellules non adhérentes au filtre.

v. Entretien Le milieu de culture sous-nageant (milieu de nutrition) est remplacé toutes les 24 heures et les cultures sont maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié avec un air enrichi en CO_2 (5%). Les cellules sont observées quotidiennement au microscope optique pour juger de la confluence de la culture. La confluence du tapis cellulaire qui reproduit la barrière épithéliale est obtenue entre les jours 3 et 4. La différenciation en épithélium cilié et sécrétoire s'effectue progressivement, pour aboutir à un épithélium « mature » vers 14-15 jours. La culture garde ensuite des propriétés physiologiques stables pendant une quinzaine de jours, avant d'évoluer vers l'apoptose du tapis cellulaire [Escudier et al., 1998].

3.2.2 Difficultés et mise au point

De nombreux problèmes quand à la culture cellulaire se sont posés durant cette thèse. Après diverses stratégies présentées plus en détails en §5.7, nous avons finalement obtenu un modèle différencié de culture primaire. L'amélioration de la différenciation cellulaire est passé par la modification du protocole en utilisant lors de la phase d'entretien le milieu PneumaCult™-ALI (StemCell Technologies, Canada). Ce milieu permet d'obtenir une différenciation ciliée au bout de 21 jours de culture en interface air-liquide. Le temps nécessaire à cette phase de mise au point explique le faible nombre de cultures présentées en résultats.

3.2.3 Patients inclus dans l'étude sur les cultures de CENH

L'ensemble des patients inclus étaient adressés au bloc opératoire de Créteil pour polypose naso-sinusienne, pour lesquels une indication chirurgicale (ethmoïdectomie endonasale) est posée. Les patients sont informés et leur consentement écrit avant l'intervention est recueilli en vue de l'utilisation des polypes (considérés comme déchets opératoires) pour réaliser des cultures et des recherches sur la physiopathologie des maladies respiratoires. Cette étude a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes Ile de France X (référence avis № 2016-01-01).

4 | Matériels et Méthodes de l'évaluation du battement ciliaire

Je présente dans un premier temps la vidéo-microscopie à haute vitesse qui sert de support aux différentes analyses effectuées sur les cellules ciliées provenant des brossages nasaux. Je décris ensuite les outils d'évaluation des paramètres classiques du battement ciliaire, puis les nouveaux développements mis au point durant cette thèse. Je développe ensuite une méthode originale que j'ai mise au point pour estimer l'efficacité du battement ciliaire par suivi de microbilles. Je finis en décrivant la mesure de la force exercée par les cils en microscopie à force atomique (AFM), mesure qui s'effectue sur les cultures de CENH.

4.1 Vidéo-microscopie à haute vitesse

4.1.1 Matériels

Le laboratoire dispose d'un banc de vidéo-microscopie à haute vitesse (Fig. 4.1). Il se compose :

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

FIGURE 4.1 – **Photo du banc de vidéo-microscopie à haute vitesse**. Comprend le microscope, la platine motorisée, la caméra haute vitesse et l'ordinateur de contrôle.

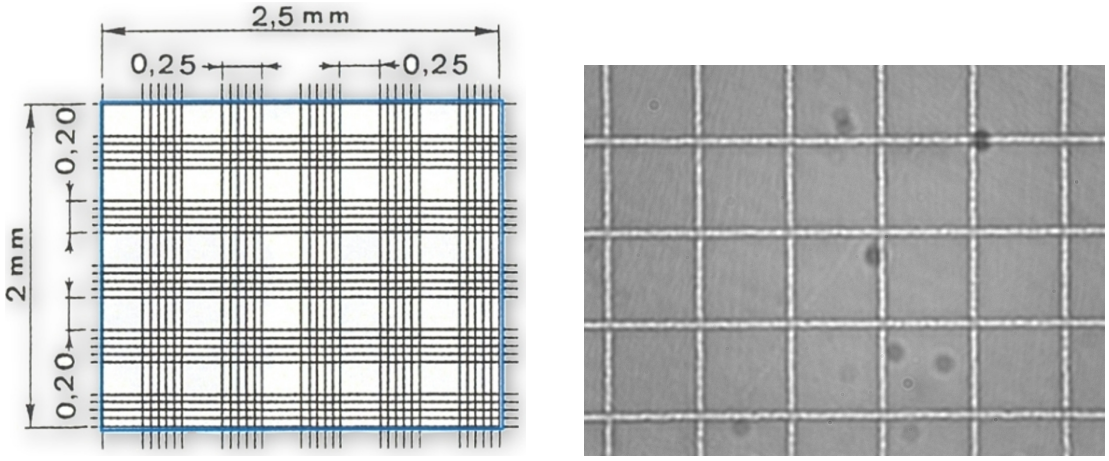
Avec cette caméra, la taille de l'image (c.a.d. le champs d'observation) modifie la vitesse maximale d'acquisition. Plus la résolution d'image est grande, moins la vitesse d'acquisition est élevée. Un compromis optimal doit donc être trouvé entre ces deux paramètres. Dans la suite de ce document et sauf contre indication, comme dans le paragraphe suivant, nous avons privilégié la vitesse d'acquisition par rapport à la taille des images. Ainsi une séquence d'enregistrement est typiquement constituée par un set de 1800 images de 192 × 256 pixels obtenu avec une vitesse d'acquisition de 358 images par seconde (soit un peu plus de 5 secondes d'enregistrement).

4.1.2 Mesure de la taille des pixels

Afin de faire des mesures de distance, nous devons connaitre la taille d'un pixel. Pour cela nous avons utilisé une cellule de Malassez. Il s'agit d'une cellule de microscopie quadrillée de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés de dimension connue qui permet le comptage cellulaire. Chaque carré mesure 50 µm de coté (Fig. 4.2(a)). En enregistrant une image à la résolution maximum (exemple en figure 4.2(b)) nous pouvons déterminer la taille réelle des pixels en fonction de l'objectif utilisé en comptant le nombre de pixel sur chaque bordure de carré. Nous avons pu nous assurer que nos images étaient constituées de pixels carrés dont la taille réelle est :

objectif ×40 : pixel (0,32 × 0,32) μm^2

objectif ×100 : pixel (0,13 × 0,13) μm^2



(a) Schéma de la grille gravée sur une cellule de Malassez

(b) Image de la cellule de Malassez au travers de la caméra avec un objectif ×40. Un carré mesure 50 µm de coté.

FIGURE 4.2 – **Mesure de la taille d'un pixel grâce à l'utilisation d'une cellule de Malassez**.

4.1.3 Protocole expérimental pour l'enregistrement de films

Afin d'observer les cellules épithéliales nasales obtenues par brossage, nous préparons une lame de 3,5 cm sur laquelle nous disposons un cercle de graisse d'environ 1 cm de diamètre (Fig. 4.3). A l'intérieur de ce cercle de graisse, nous disposons 80 à 100 µl de suspension cellulaire en fonction de l'expérience. Afin de stabiliser autant que faire se peut l'échantillon, nous ajoutons par dessus, une lamelle de 1,5 cm de diamètre. L'ensemble lame/lamelle peut ensuite être déposé sur la platine du microscope pour observation à l'objectif ×40 et enregistrement.

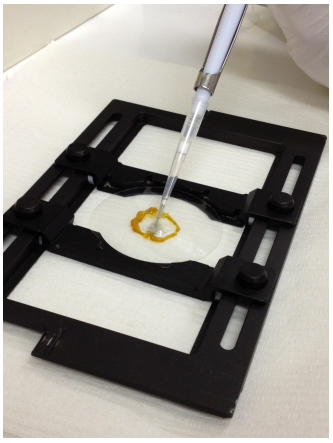


FIGURE 4.3 – **Photo du dépôt de cellules sur la lame du microscope**. Un rond de graisse d'environ 1 cm de diamètre contient 80 à 100 µl de cellules en suspension

Le balayage systématique de la zone délimitée par le cercle de graisse permet alors de repérer les bordures ciliées et de les enregistrer. Comme recommandé par [Thomas et al., 2009], les cellules ciliées isolées sont exclues car se sont des cellules en train de mourir et le battement de leur cils ne serait pas représentatif. D'une manière générale nous ne conservons que les bordures

ciliées continues et intactes d'une largeur minimum de 50 µm, sans mucus ou débris cellulaire et battant de profil dans le plan de la caméra.

4.2 Analyse du battement ciliaire

4.2.1 Evaluation semi-quantitative du battement ciliaire

Pour chaque brossage, nous réalisons une première évaluation du battement ciliaire à travers la détermination du pourcentage d'amas battants. Sur les 10 premières bordures observées le battement est scoré comme suit :

- une bordure épithéliale avec une majorité de cils battants est scorée 1 ;
- une bordure avec la moité de cils battants est scorée 0,5 ;
- une bordure avec une minorité de cils battants est scorée 0,1
- une bordure sans cil battant est scorée 0.

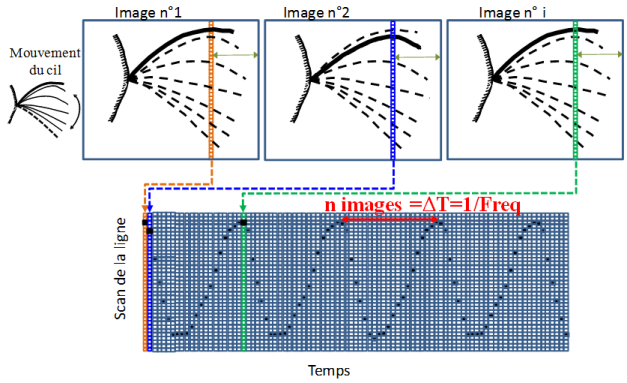
Le pourcentage d'amas battants est défini par la somme de ces scores divisé par 10. L'intérêt de ce pourcentage est de permettre la prise en compte de l'hétérogénéité de certains prélèvements, où certaines bordures peuvent présenter un battement différent, et de pas se focaliser uniquement sur "le cil battant qui cacherait la forêt". Dans la suite, nous verrons que ce pourcentage pourrait être utiliser pour sélectionner le type d'analyse à réaliser sur les brossages.

4.2.2 Outils de mesure de la fréquence du battement ciliaire

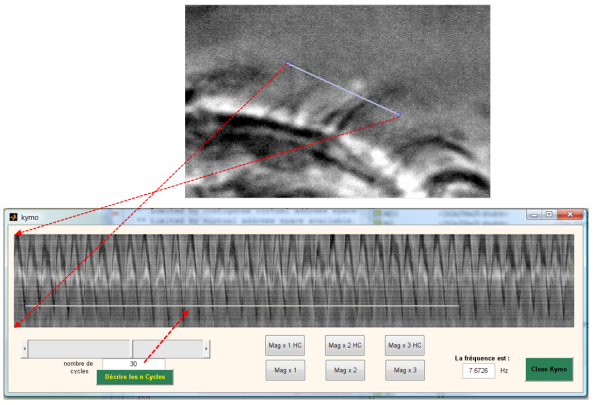
Le premier paramètre mesuré pour caractériser le battement ciliaire est historiquement la fréquence du battement ciliaire (FBC). Nous utilisons deux techniques différentes pour obtenir cette fréquence. Ces deux outils sont utilisables sur un logiciel de conception interne développé à partir de la plateforme Matlab.

Vidéo-kymographie

La vidéo-kymographie consiste à définir une ligne de pixels sur la première image du film et à suivre l'évolution de cette ligne au cours du temps image après image. Pour cela, on accole à la ligne de la première image les lignes des images suivantes sur un même graphique (Fig. 4.4(a)). La nouvelle image composée par ces lignes fait alors apparaitre une succession de "vagues" dont la périodicité, égale au nombre d'images divisé par la vitesse d'acquisition, est l'inverse de la fréquence recherchée . Pour notre application, on définit une ligne au travers de la bordure ciliée, le fond clair contrastant avec les cils, plus foncés (Fig. 4.4(b)).



(a) Principes de la vidéo-kymographie : En haut, la même ligne est définie sur les images successives. En bas, le graphique obtenu par l'association des lignes des images successives permet de visualiser l'évolution de la pointe du cil.

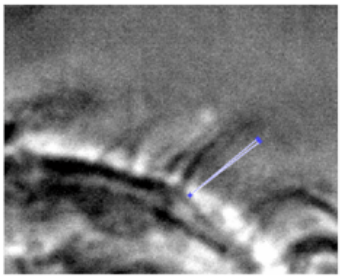


(b) En haut, une ligne de pixels est définit au travers de la bordure cilié. En bas, la période de l'onde observée permet d'obtenir la fréquence de battement ciliaire. La flèche rouge désigne le nombre de période mesurée.

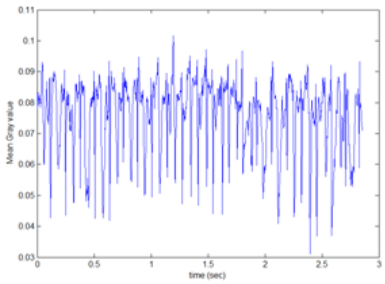
FIGURE 4.4 – **Principe de la mesure de fréquence par vidéo-kymographie**.

Transformée de Fourier

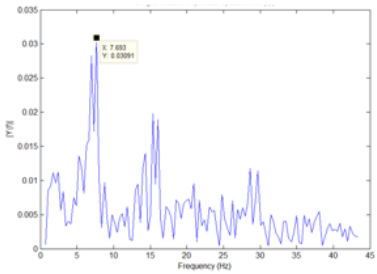
L'analyse en niveau de gris consiste à calculer sur chaque image le niveau de gris moyen d'une ligne de pixels (ou éventuellement d'une région).Usuellement, nous utilisons la même ligne que précédemment décrite pour la vidéo-kymographie. Lorsqu'il y a un mouvement, le niveau de gris moyen de la ligne de pixels évolue au cours du temps. Une simple transformée rapide de Fourier (FFT) de ce niveau de gris permet d'obtenir le spectre fréquentiel correspondant (Fig. 4.5). La fréquence fondamentale de ce spectre correspond à la fréquence de battement ciliaire.



(a) Définition de la zone à analyser (ligne en bleu)



(b) Évolution du niveau de gris en fonction du temps



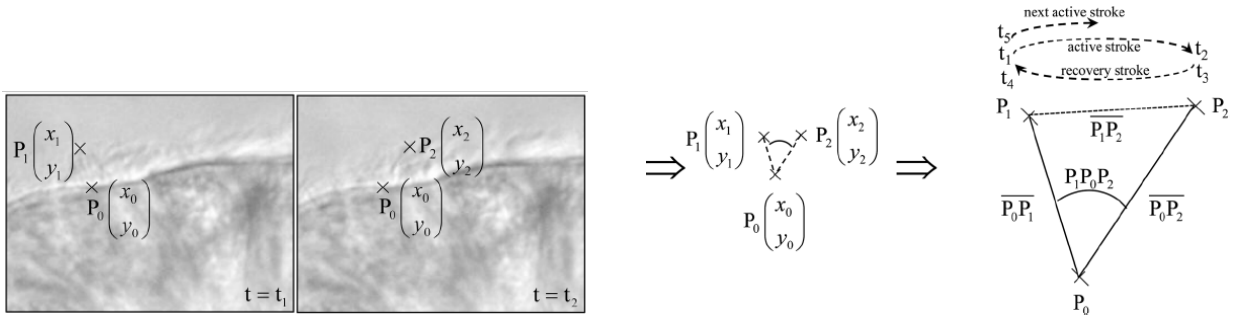
(c) Spectre fréquentiel du niveau de gris

FIGURE 4.5 – **Analyse du niveau de gris par transformée de Fourier**.

4.2.3 Analyse cinématique du battement ciliaire

Publié par [Papon et al., 2012], l'analyse cinématique permet une description objective des paramètres du battement ciliaire. Il s'agit pour un opérateur, grâce à la possibilité de faire défiler le film au ralenti voir image par image, d'arriver à isoler et à suivre les extrémités d'un cil au cours d'un cycle complet. 3 points et 5 temps sont alors déterminés (Fig. 4.6) :

- Pour les points, il y a la position de la base du cil (P_0), ainsi que la position de l'autre extrémité du cil avant et après la phase aller (P_1 et P_2, respectivement) comme montré en Fig. 4.6(a).
- Pour les temps, il y a les temps de début phase aller (t_1), fin phase aller (t_2), début de la phase retour (t_3), fin de la phase retour (t_4) et début de la phase aller suivante (t_5).



(a) Position des points P_0, P_1 et P_2 sur un film au temps t_1 : debut de phase aller et t_2 : fin de phase aller

(b) Calcul des paramètres de l'analyse cinématique

FIGURE 4.6 – **Principe de l'analyse cinématique du battement ciliaire**.

Ceci permet de définir 12 paramètres quantifiés décrivant le battement ciliaire :

- longueur du cil
- angle de battement
- fréquence de battement ciliaire
- durée de la phase aller
- durée de la phase retour
- durée de pause entre phase aller et phase retour
- durée de pause entre phase retour et phase aller suivante
- durée de pause total
- distance parcourue par la pointe du cil (corresponds à l'amplitude du battement) par seconde
- aire couverte par le cil par seconde
- distance parcourue par seconde pondérée par le pourcentage d'amas battant
- aire couverte par seconde pondérée par le pourcentage d'amas battant

[Papon et al., 2012] a démontré que la distance parcourue par la pointe du cil par seconde pondérée par le pourcentage d'amas battants au sein d'un prélèvement était le meilleur paramètre pour discriminer des patients atteints de DCP et des patients contrôles avec une spécificité et une sensibilité proche de 95%. Néanmoins cette analyse qui requière d'extraire un cil, reste relativement lourde à mener pour l'opérateur même s'il existe une interface développée au laboratoire sur une plateforme Matlab permettant d'enregistrer positions et temps à partir d'un simple clic de souris et de faire automatiquement les calculs trigonométriques. Aussi, pour minimiser les erreurs, cette analyse est systématiquement associée à la mesure de la fréquence par vidéo-kymographie et FFT. En cas de discordance entre les 3 mesures de fréquence, l'analyse cinématique est rejetée.

4.3 Nouveaux développements pour l'analyse du battement ciliaire

Dans le cadre de cette thèse, j'ai été amené à enrichir l'analyse du battement ciliaire en développant de nouvelles évaluations basées sur la VMHV et une extension de l'analyse cinématique. Tout d'abord, j'ai développé une méthode de mesure de la longueur d'onde de l'onde métachrone (LOOM) adaptée à nos échantillons. Si l'on trouve quelques estimations/-mesures de la LOOM sur des modèles animaux, il n'existe pas à ma connaissance d'évaluation de la LOOM chez l'humain alors que cette longueur d'onde est pourtant un paramètre d'entrée important des modèles numériques du transport de mucus proposés dans la littérature [Ross and Corrsin, 1974, Velez-Cordero and Lauga, 2013]. Dans un second temps, j'ai également cherché à caractériser la densité de cils de nos échantillons. En effet je m'attends à ce que l'effet du battement ciliaire soit, au moins en partie, lié au nombre de cils mis en œuvre. Enfin, et pour justifier un certain nombre de paramètres du modèle numérique proposé dans cette thèse, j'ai voulu décrire la trajectoire de la pointe du cil sur un cycle complet de battement.

4.3.1 Longueur d'onde de l'onde métachrone

La longueur d'onde de l'onde métachrone λ est déterminée à partir de la variation de la phase sur 100 lignes parallèles entre elles et perpendiculaires à la bordure ciliée. Pour cela, nous réalisons une FFT par ligne le long de la bordure (Fig. 4.7). Si on suppose que la variation de phase Θ est linéaire avec la distance x (c'est à dire la position le long de la bordure), alors on a

$$\Theta(x) = \Theta(x = 0) + p_t x \tag{4.1}$$

où p_t est une constante définissant la variation linéaire de la phase. p_t est facilement calculable comme étant la pente de la régression linéaire entre Θ et x. La longueur d'onde est alors donnée par :

$$\lambda = 2\pi/p_t \tag{4.2}$$

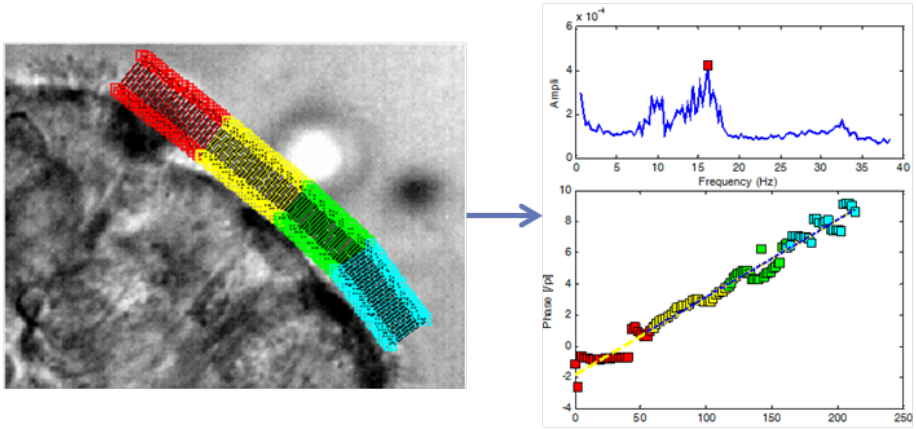
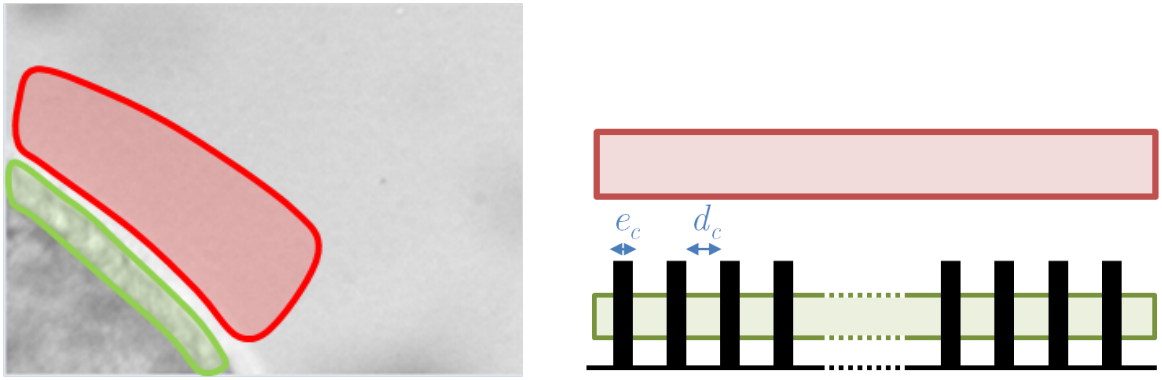


FIGURE 4.7 – **Principe de la mesure de la longueur de l'onde métachrone**. A gauche, 100 FFT du niveau de gris de lignes parallèles le long de la bordure ciliée sont effectuées. A droite, une régression linéaire entre la position et la phase de la fréquence fondamental (déterminée par la FFT en haut) est ensuite effectuée (en bas) pour obtenir la longueur d'onde de l'onde métachrone

4.3.2 Densité relative de cils

La densité relative de cils est évaluée en comparant le niveau de gris moyen du fond de l'image avec le niveau de gris de la zone contenant les cils. Dans une image, les cils apparaissent plus foncés que le fond. En supposant en première approximation que les cils ne se chevauchent pas, la densité relative de cils peut être approximée par la fraction d'aire occupée par les cils, c.a.d. par le ratio entre le nombre de pixels appartenant à la bordure ciliée plus foncé que la moyenne du niveau de gris du fond N_c et le nombre total de pixels N_p (Fig. 4.8(a)). La densité relative de cils ρ_c est donné par :

$$\rho_c = \left(\frac{N_c}{N_p}\right)\Big|_{\text{zone ciliée}} \tag{4.3}$$



(a) Défintion des zones sur une image de bordure ciliée

(b) Schéma de la distribution de cils

FIGURE 4.8 – **Principe de la densité relative de cils**. La zone verte correspond à la zone ciliée et la zone rouge correspond au fond.

Il est intéressant de noter que l'on peut aussi estimer avec ce type de procédure la fraction d'aire libre entre les cils f_c ainsi que la distance entre 2 cils d_c (Fig. 4.8(b)). Si l'on considère une distribution homogène des cils alors la densité relative de cils ρ_c est donnée par :

$$\rho_c = \frac{(e_c/\text{taille d'un pixel}) \times \text{nombre de cils}}{\Big[(e_c + d_c)/\text{taille d'un pixel}\Big] \times \text{nombre de cils}} = \frac{e_c}{e_c + d_c} \tag{4.4}$$

alors que la fraction d'aire libre entre les cils f_c est donnée par :

$$f_c = \frac{d_c}{e_c + d_c} = 1 - \rho_c \tag{4.5}$$

et que la distance entre 2 cils d_c est donnée par :

$$d_c = \frac{e_c(1 - \rho_c)}{\rho_c} \tag{4.6}$$

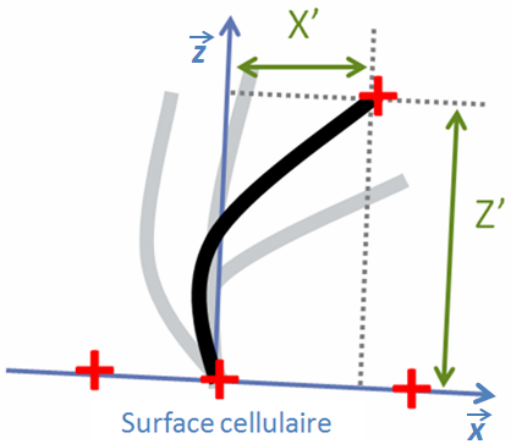
où e_c est le diamètre du cils (0,2 µm). Nous verrons pas la suite (chapitre 8.1) que ces paramètres seront utilisés pour intégrer des pertes sous forme de glissement entre les cils et le fluide.

4.3.3 Trajectoire de l'extrémité des cils

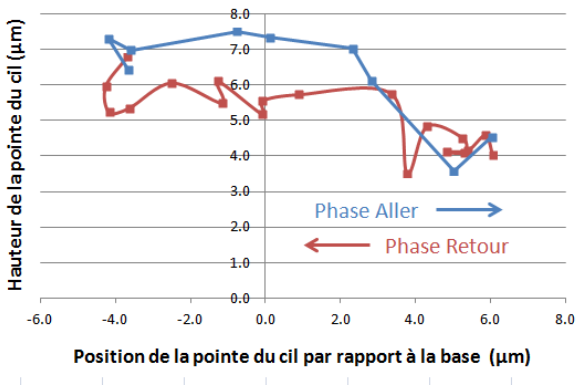
La trajectoire est simplement obtenue en ajoutant à la procédure d'analyse cinématique la détermination de l'extrémité libre du cil à chaque instant (c.a.d à chaque image) du cycle et non plus seulement en 2 temps particuliers (début phase aller et fin phase aller). Pour cela, sur chaque image, nous enregistrons la position de 4 points (Fig. 4.9(a)) :

- position de la pointe du cil
- position de la base du cil
- 2 points qui correspondent à la position de la paroi cellulaire de part et d'autre de la base du cil

Nous pouvons alors pour chaque image définir la position de la pointe du cil libre dans le repère dont l'origine est la position de la base du cil, dont l'axe "horizontal" x passe par la droite représentant la paroi cellulaire et dont l'axe verticale z passe par la base du cil. Cela nous permet de définir, sur chaque image, 2 paramètres : la hauteur de la pointe par rapport à la surface (Z') et la distance entre l'axe verticale et la pointe du cils (X'). L'ensemble de ces paramètres (X', Z' et t, le temps) définit la trajectoire de la pointe du cil (voir exemple Fig 4.9(b)).



(a) Principe du suivi de la position de la pointe du cil au cours du cycle de battement. 4 points (croix rouges) sont définis à chaque instant (c.a.d., sur chaque image) pour définir la position de la pointe du cil, de la base du cil et de la paroi cellulaire. Les distances X' et Z' permettent de définir la position de la pointe du cil dans le repère qui a pour origine la base du cil et dont l'axe x est la paroi apicale cellulaire.



(b) Exemple de trajectoire de pointe du cil. La trajectoire durant la phase aller est en bleu et la trajectoire de la phase retour en rouge. Le sens est indiqué par les flèches.

FIGURE 4.9 – **Principe du suivi de la trajectoire de l'extrémité du cil**.

Une telle procédure, même si elle est d'un point de vue conceptuel simple, est extrêmement lourde pour l'opérateur. En effet le cil doit être suivi sur toutes les images d'un cycle complet et près de 180 points par cycle doivent être déterminés par l'opérateur si on se base sur une FBC de 8 Hz avec une vitesse d'acquisition de 358 images par seconde. Cette technique ne pourrait donc pas être proposée en routine. D'un point de vue pratique elle nécessite aussi que les films soient enregistrés à l'objectif ×100 afin de pouvoir distinguer et séparer les cils entre eux de manière un peu plus aisée.

4.4 Evaluation de l'écoulement par le battement ciliaire par suivi de microbilles

Certains patients atteints de DCP, malgré un battement dont la fréquence semble correct, présentent une altération de l'épuration mucociliaire. Afin d'estimer l'efficacité "globale" du battement ciliaire, j'ai développé une méthode originale de suivi de microbilles. Ces microbilles, ajoutées dans le milieu contenant les cellules ciliées, sont des marqueurs du courant généré par le battement ciliaire.

4.4.1 Protocole expérimental pour l'enregistrement des films de suivi de microbilles

Reprenant le protocole précédemment expliqué en section 4.1.3, nous ajoutons 20 µl d'une solution fille de microbilles dans les 80 µl de solution cellulaire contenant les cellules épithéliales de brossage nasal pour observation entre lame et lamelle avec un objectif ×40. Nous conservons les précédents réglages de la caméra : images de 192 × 256 pixels, une vitesse d'acquisition de 358 images par seconde et un film de 1800 images.

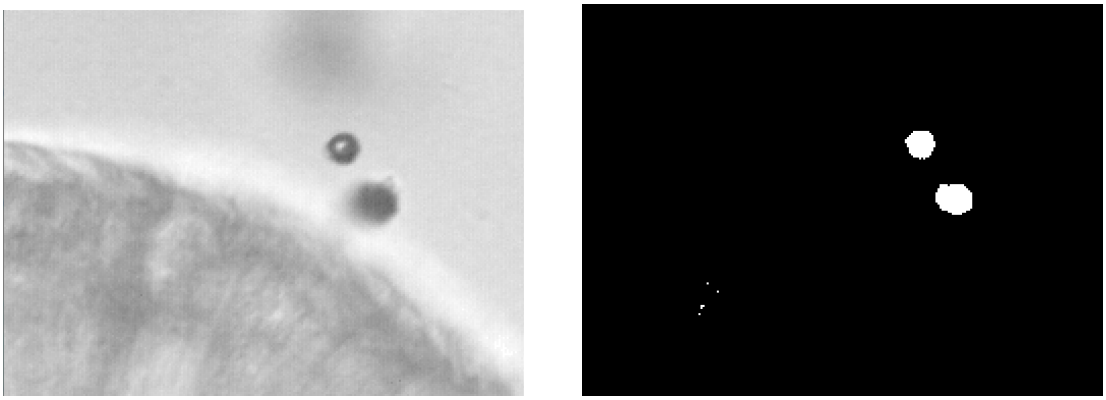
Microbilles

Les microbilles utilisées sont des microbilles de polystyrène de 4,5 µm de diamètre (Polybead© Microspheres, Polysciences, Inc.). Selon la fiche technique, la taille des microbilles est relativement uniforme avec un diamètre compris entre 4 et 4,9 µm. Elles sont donc dans le même ordre de grandeur que les cils (qui mesurent pour rappel 6 µm de long). Leur densité est de 1,05 et elles sont non-poreuses, ce qui signifie qu'elles coulent dans nos échantillons aqueux et ne restent pas en suspension. La solution mère, commercialisée par Polysciences Inc., présente une concentration de 2,5%w/v (unité de concentration massique, masse/volume). L'ajout de microbilles obscurcit les films, nous devons donc trouver un compromis entre concentration des microbilles dans le milieu et luminosité des films. Nous utilisons une solution diluée à 5 % à une concentration 1,25 mg.ml^{-1}.

4.4.2 Analyse post-enregistrement pour le suivi de microbilles

Traitement des images classique

La première étape du suivi de microbilles consiste en un traitement d'images classique où une série de filtres permet d'isoler les microbilles du reste de l'image. Le premier filtre utilisé permet d'augmenter le contraste par étalement de l'histogramme, puis l'image est inversée (le blanc devient noir et inversement) afin de rendre les microbilles blanches. En soit l'inversion de l'image n'apporte rien si ce n'est qu'elle permet de se conformer à la convention du traitement de l'image qui veut que l'on suive des objets blancs sur un fond noir. Le second filtre consiste à seuiller l'image afin d'obtenir une image binaire avec le fond en noir et les microbilles en blanc (Fig. 4.10).



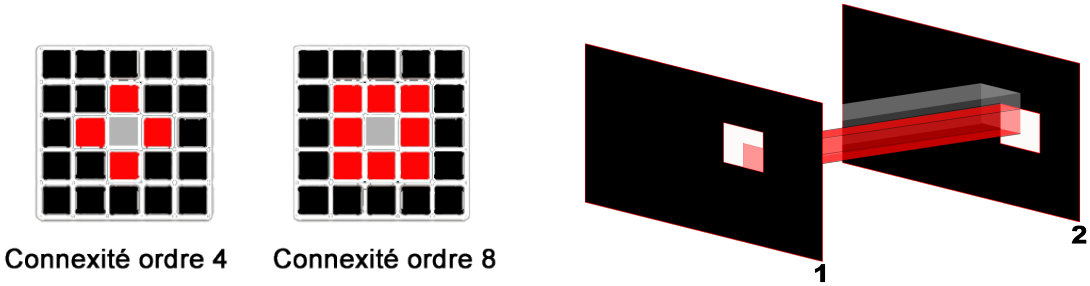
(a) Image brute avant traitement

(b) Image après traitement

FIGURE 4.10 – **Exemple du traitement d'images pour le suivi de microbilles**.

Définition et labellisation des régions d'intérêts

Cette seconde étape consiste à détecter les microbilles sur les images préalablement traitées et à les suivre. A partir des images binaires noir et blanc (Fig. 4.10(b)), nous pouvons séparer les régions blanches entre elles et les suivre dans le temps grâce à un filtre de labellisation basé sur des propriétés de connexité. Dans le film, chaque pixel blanc qui possède un "lien" avec un autre pixel blanc sera considéré être dans une même et unique région. Ce lien est défini par l'indice de connexité. Ainsi sur une image, on définit, par exemple qu'un pixel appartient à une région si au moins l'un de ses 4 ou 8 voisins appartient à cette région (Fig. 4.11(a)). Dans notre cas, une connexité de 4 a été retenue car suffisant pour rendre compte de la forme des microbilles et moins gourmand en temps qu'une connexité de 8 pixels. Il faut ensuite définir le suivi dans le temps (donc dans le film) . Si l'on empile deux images successives et qu'une région de l'image 1 a au moins 1 pixel en commun avec une région de l'image 2, alors ces 2 régions sont connexes et ne forme qu'une seule et même région dans le temps (Fig. 4.11(b)). Chaque région peut alors être numérotée avec un numéro unique qui permet de la suivre au cours du temps (donc dans le film). Ce numéro est le label de la région.



(a) Schéma de la connexité. Le pixel concerné est en gris et les pixels connexes en rouge

(b) Exemple schématique de connexité temporelle. L'image 1 précède l'image 2 dans le film. La région de l'image 1 est projetée sur l'image 2 en gris et la partie commune (connexe) est en rouge

FIGURE 4.11 – **Principe de la connexité**.

Détection des microbilles

Cette étape finale consiste à extraire les paramètres du suivi de microbilles. Nous avons désormais une image binaire composée de régions numérotées. En parcourant le film, nous pouvons suivre l'évolution de ces régions au cours du temps. Afin de ne suivre que les microbilles et d'éviter par exemple de suivre des artéfacts tels ce que l'on peut voir en bas à gauche de la figure 4.10(b) nous excluons les régions labellisées dont la taille n'est pas de l'ordre de grandeur des microbilles et qui n'apparaissent pas sur au moins 50 images successives. En pratique les régions dont l'aire était inférieure à 150 pixels (soit environ 15 μm^2) ont été exclues. Si l'on considère qu'une microbille est un cercle parfait de diamètre 4,5 µm, son aire est égale à environ 15,9 μm^2. La position de chaque région est alors déterminée par les coordonnées de leur barycentre. En raison de la vitesse d'acquisition des films et du principe de connexité, la vitesse maximale observable est de 1600 $\mu m.s^{-1}$. Les résultats semblent indiquer que cette limite est purement théorique pour nos besoins.

Paramètres de sortie du suivi de microbilles

Les coordonnées du barycentre de chaque région/bille permettent alors d'obtenir simplement :

- Trajectoire (voir exemple en Fig. 4.12)
- Vitesse instantanée et vitesse moyenne
- Distance instantanée et distance moyenne entre la microbille et les cils

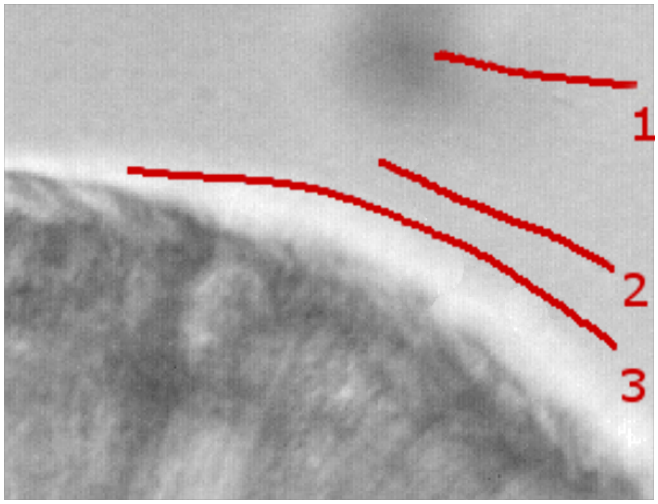


FIGURE 4.12 – **Exemple de trajectoires de microbilles sur une bordure**. Les trajectoires sont tracées en rouge. Chaque numéro correspond à une microbille.

La vitesse instantanée est la vitesse de déplacement entre 2 images successives. La vitesse moyenne est la vitesse de déplacement calculée entre la première et la dernière position. La distance entre la microbille et la bordures ciliée est déterminée en assimilant cette bordure à une série de 4 segments droits définis et en recherchant la distance minimale de la section de droite normale à un des 4 segments et passant par la microbille (Fig. 4.13).

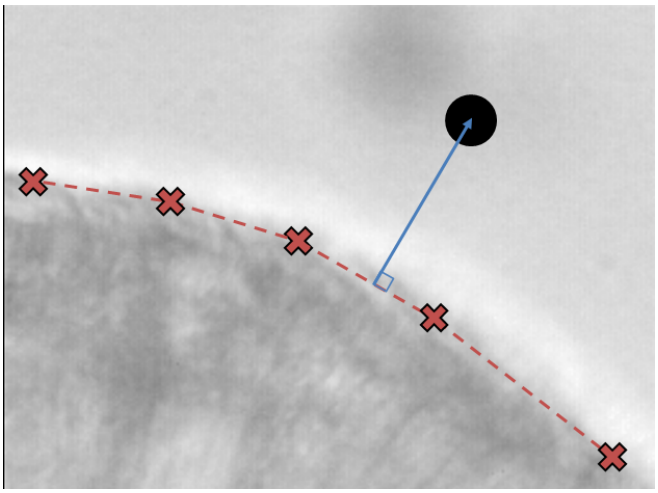


FIGURE 4.13 – **Schéma du calcul de la distance entre la microbille et la bordure ciliée**. La bordure ciliée est schématisée par 5 points et 4 segments (en rouge). La microbille est schématisée par un cercle noir. La distance (en bleu) entre la microbille et la bordure ciliée est mesurée sur la normale au segment de bordure concerné.

Afin de limiter au maximum le temps opérateur, l'ensemble de cette procédure a été automatisée à l'aide d'un programme écrit en langage Python. L'opérateur a juste à définir 1/ le contour de la bordure ciliées avec 4 segments droits (5 clics de souris) et 2/ la valeur de seuillage de l'image. L'ensemble des paramètres de sorties est alors automatiquement stocké sur un tableur pour traitement ultérieur.

4.5 Mesure de force par microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM selon son acronyme en anglais), apparue en 1986 [Binnig et al., 1986], est une forme de microscopie à sonde locale qui a emergé ces deux dernière décades comme un outil polyvalent pour l'étude des échantillons biologiques [Morris et al., 1999, Müller and Dufrene, 2008]. Si l'on peut considérer le microscope optique comme une extension de la vision, alors on peut considérer l'AFM comme une extension du sens du toucher [Gautier et al., 2015].

4.5.1 Principe de la microscopie à force atomique (AFM)

L'AFM permet de générer et de mesurer des interactions physiques entre une lame souple de quelques millimètres et l'échantillon d'intérêt. Schématiquement une unité d'AFM se compose de :

- une lame souple (cantilever, selon le terme anglais, qui sera utilisé dans la suite du manuscrit) à l'extrémité duquel peut se trouver, ou non, une pointe de forme et de dimensions variables.
- un contrôleur piézoélectrique sur lequel l'une des extrémité du cantilever se fixe rigidement
- une photo-diode 4 quadrants
- un laser, lié rigidement au contrôleur, dont le rayon, focalisé sur l'extrémité libre du cantilever, se reflète via un miroir sur la photo-diode.

Lorsque l'extrémité libre du cantilever est mis en contact avec l'échantillon, il y exerce une force qui s'équilibre avec celle induite par l'échantillon sur le cantilever (ressort) qui se déforme. Cette déflexion induit un changement de la réflexion du rayon laser qui est détectée et mesurée par la photo-diode. La connaissance de la raideur du cantilever permet alors de déduire la force exercée par le cantilever sur l'échantillon. Un système de boucle de rétroaction peut ajuster le mouvement du contrôleur piézoélectrique dans la direction z pour maintenir une force constante entre la pointe du cantilever et la surface de l'échantillon (Fig. 4.14). Le déplacement du cantilever et la force qu'il exerce sont les paramètres de sortie de l'AFM. La précision de ces paramètres est inférieur au nanomètre pour le déplacement et peut, en fonction du cantilever utilisé, être inférieur au pico Newton pour la force avec une résolution temporelle de quelques milisecondes.

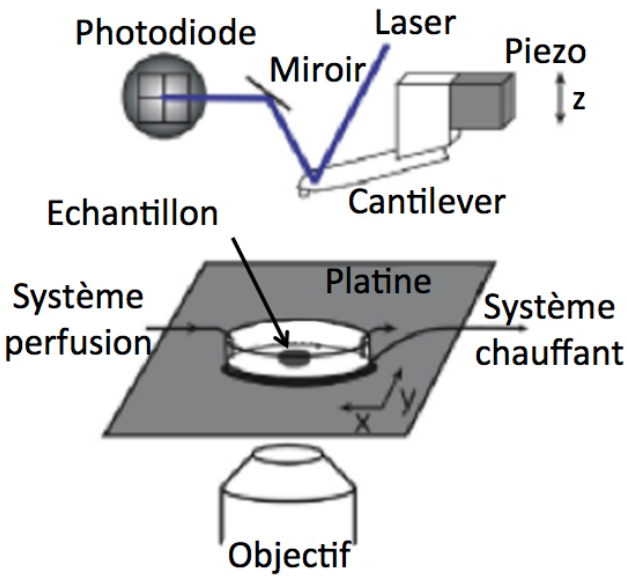


FIGURE 4.14 – **Schéma de l'installation de l'AFM**. Modifié d'après [Gautier et al., 2015]

4.5.2 Banc expérimental

Le laboratoire dispose d'un banc de microscopie à force atomique couplé à un microscope optique. Il se compose :

- d'un microscope à force atomique Nanowizard 3 (JPK Instruments AG)
- d'une platine Cell Hesion (JPK Instruments AG) mobile selon les directions x et y
- d'une caméra DFK31AF03 (JPK Instruments AG) annexée à un ordinateur comprenant un système d'exploitation JPK Desktop (JPK Instruments AG) pour l'utilisation de l'AFM
- d'un microscope optique inversée AxioObserver Z1 (Carl Zeiss) installé sur un système actif anti-vibration TS-150 (Table Stable LTD) pour isoler des perturbations extérieures

4.5.3 Protocole expérimental pour l'évaluation de la force exercée par les cils

La mesurer la force exercée par les cils est obtenue à partir d'un protocole proche de celui décrit par [Teff et al., 2007].

Préparation de l'échantillon Après différenciation, le filtre sur lequel les CENH ont été cultivées est découpé à l'aide d'un scalpel et détaché du fond de l'insert Transwell. En faisant attention au sens pour que les cellules soit bien vers le haut, le filtre est fixé en 3 points sur le fond d'une boite de Pétri à fond en verre (Techno Plastic Product). Nous ajoutons ensuite 500 µl de milieu de survie cellulaire dans la boite de Pétri.

Choix du cantilever Il existe un grand choix de cantilevers, notamment concernant la forme de la pointe ainsi que différentes constantes de raideur. Les cultures cellulaires n'étant pas parfaitement planes, il est extrêmement difficile de déterminer le point exact de contact entre la pointe du cantilever et la surface cellulaire. En effet, avec un microscope optique, nous n'avons qu'une vue à travers le cantilever, qui n'est pas complètement transparent. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser un cantilever sans pointe Shocon-TL (AppNano) dont la constante de raideur était compatible avec l'ordre de grandeur des forces mesurées dans la littérature (environ une centaine de picoNewton).

Calibration de la mesure de force La variation de position de l'extrémité libre du cantilever est mesurée par le laser se réfléchissant sur la photo-diode. Cette position est donc exprimée par une variation de Volt. L'utilisation de l'AFM commence donc toujours par une phase de calibration du cantilever afin de convertir ce signal électrique en une mesure directe de la force ressentie par le cantilever. Cette calibration se déroule en 2 étapes :

- Dans un premier temps, la sensibilité du système optique est déterminée. L'extrémité libre du cantilever est appuyée contre le fond d'une boite de Pétri jusqu'à ce qu'une tension prédéfinie (par exemple 1 V) soit atteinte. Puisque la variation de hauteur du système piézoélectrique est connue grâce au capteur de position, la relation distance/tension peut être déterminée. Cette

relation est appelée "sensibilité" et est exprimée en nm/V. Il faut noter que pour cette première étape, on considère que le fond de la boite de Pétri est parfaitement rigide par rapport à la force appliquée. Après cette étape, la tension de sortie de la photo-diode (et donc la déflexion du cantilever) est directement affichée en nm par le logiciel de l'AFM.

– Dans un second temps, la rigidité du cantilever (donnée en N/m) est calculée par une méthode d'oscillation par bruit thermique. Cette fonction est directement intégrée au sein du logiciel JPK de contrôle de l'AFM. En quelques mots, le cantilever est un objet oscillant (comme un pendule). Sous l'effet de la température (bruit thermique), il oscille à sa propre fréquence de résonance. La rigidité du cantilever est alors déduite du spectre du signal de déflexion en utilisant le modèle publié par [Butt and Jaschke, 1995]. Après cette étape de calibration, le signal de déflexion du cantilever est directement exprimé en nN.

Mesure de la déflexion du cantilever Tout d'abord nous définissons par une courbe d'approche la position sur l'axe vertical du tapis cellulaire. Cette position définira l'altitude $z = 0$. Une courbe d'approche consiste à définir un seuil de déflexion (donc de force), puis à faire descendre graduellement le cantilever jusqu'à ce qu'il atteigne ce seuil de déflexion, c.a.d., jusqu'à ce qu'il entre en contact avec la surface solide. Afin d'arrêter la descente au niveau du tapis cellulaire et non pas un peu au dessus au moment du contact avec les cils, le seuil de force utilisé est fixé à 0,5 nN (soit près d'un ordre de grandeur plus élevé que la force mesurée par [Hill et al., 2010] sur des cultures de cellules bronchiques). Ensuite, nous positionnons le cantilever à $z = 7$ µm, ce qui correspond environ au niveau de la pointe des cils. Pour les mêmes coordonnées x et y du cantilever, nous mesurons aussi la déflexion à une altitude $z = 200$ µm (voir Fig. 4.15) afin de pouvoir soustraire le bruit de fond de notre signal. Pour chacune de ces altitudes nous enregistrons l'évolution de la déflexion pendant 8 secondes à la fréquence d'échantillonnage de 1 kHz.

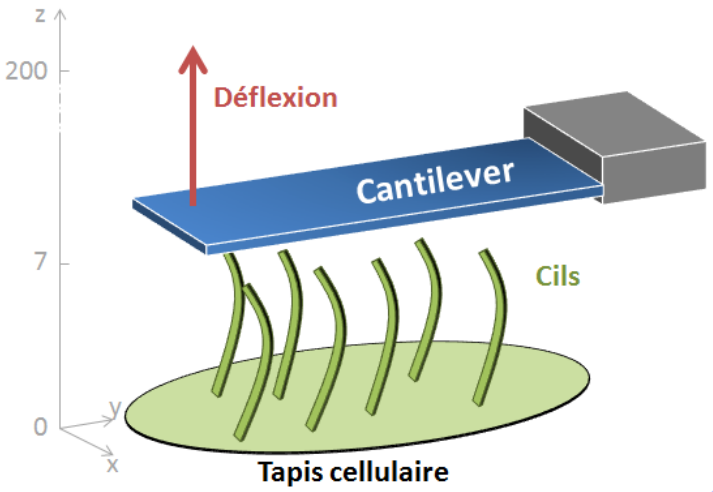


FIGURE 4.15 – **Schéma du protocole de spectroscopie de force en AFM au contact des cils**. Les différentes altitudes z sont notées sur l'axe à gauche de la figure.

En parallèle, le battement ciliaire est enregistré par VMHV, afin de pouvoir extraire la FBC par les techniques de mesures de fréquences précédemment décrites en §4.2.2.

5 | Résultats et Discussion de l'évaluation du battement ciliaire

J'utilise des microbilles comme marqueurs du flux généré par les cils. La première étape a donc été de quantifier l'effet potentiel des microbilles sur le battement ciliaire. Pour cela, j'ai réalisé une étude préliminaire afin de déterminer l'influence de la présence de microbilles sur la FBC. Dans un second temps, j'ai analysé les paramètres du battement ciliaire ainsi que les paramètres du suivi de microbilles sur des brossages nasaux. Puis dans l'idée de simuler numériquement la vitesse des microbilles et donc le flux généré par les cils, j'ai été amené à décrire la trajectoire de la pointe d'un cils pendant un cycle de battement. Cela a été réalisée sur des films issus de données rétrospectives filmées avec un objectif ×100 dont la magnification supérieure (par rapport à un objectif ×40) permet d'obtenir le suivi individualisé d'un cil de manière plus aisée. Enfin, pour finaliser l'analyse du battement ciliaire, j'ai souhaité avoir une idée de la force générée par les cils. Pour cela, j'ai utilisé un modèle de culture d'épithélium respiratoire.
L'ensemble des tests statistiques présentés dans la suite de ce manuscrit a été effectué à l'aide du logiciel de statistiques Statistica v7.1 (Stat Soft ®).

5.1 Patients et sélection des brossages nasaux

Au cours de cette thèse, 45 patients, dont 24 femmes et 21 hommes, ont été recrutés pour un brossage nasal au sein du service d'ORL de Créteil ou du Kremlin-Bicêtre (enregistré avec un objectif ×40). Tous ces patients sont négatifs au diagnostic de dyskinésies primaires.
Les brossages de 10 autres patients, faisant partie de la base de données publiée par [Papon et al., 2012], ont également été utilisés pour l'étude de la trajectoire de la pointe des cils (enregistrés avec un objectif ×100). Ces brossages font partie d'un groupe considérés comme "contrôle" pour lesquels le diagnostic de la DCP a été exclu.

Sur les 45 "nouveaux" brossages, 9 brossages (soit 20% des brossages) n'ont pas permis d'observer de cils, soit par absence de cellules ciliées, soit par absence de cils. Parmi les 36 brossages présentant des cils, 14 brossages (soit 31% des brossages) furent exclus : 6 brossages qui ne présentaient que de rares cellules ciliées isolées ; 5 brossages qui ne présentaient pas de battement ciliaire, ou un mouvement résiduel quasi nul ; enfin 3 brossages qui présentaient un battement si manifestement pathologique (mouvement ralenti,...) qu'ils ne furent pas retenus

pour une analyse ultérieure. Au total aucun de ces 14 prélèvements n'avait un score d'amas battant supérieur à 50%. Finalement seuls 22 brossages (soit 49% des brossages totaux) furent retenus pour analyses ultérieures. Ces 22 brossages présentaient tous un score d'amas battants supérieur à 50%. Ces 22 brossages "battants" représentent 655 films pour lesquelles la fréquence de battement a pu être mesurée.

Afin de me rapprocher des conditions du modèle numérique présenté en chapitre 6, j'ai décidé de sélectionner les brossages dont au moins un film remplissait les conditions suivantes :

1. la bordure ciliaire observée devait être aussi plane que possible.
2. les paramètres du battement ciliaire suivants : fréquence du battement, amplitude du battement, longueur d'onde de l'onde métachrone et densité relative de cils étaient mesurables.
3. Au moins 3 microbilles par film dont les trajectoires étaient aussi parallèles que possible à la bordure ciliée ont été détectées.

Ces 3 critères ont permis de sélectionner 10 brossages (soit 22 % des brossages totaux). J'ai donc au final (Fig. 5.1) :

- 655 films, issus de 22 brossages, ayant permis une évaluation de l'influence de la présence de microbilles sur la FBC.
- 56 films, issus de 10 brossages, présentant une analyse du battement ciliaire (avec les 4 paramètres) accompagné du suivi de microbilles pour 21 bordures ciliées et 127 microbilles suivies.
- 10 films issus de 10 brossages ayant permis l'étude de la trajectoire de la pointe du cil.

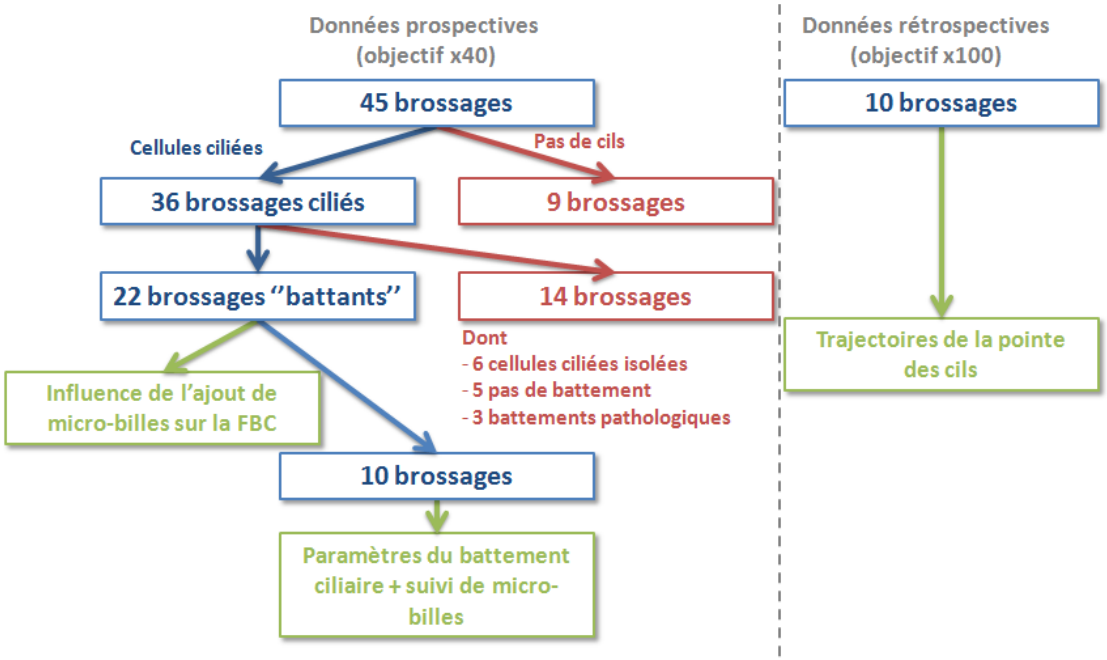


FIGURE 5.1 – **Schéma de la sélection des brossages nasaux inclus dans cette thèse**. 22 brossages avec un battement ciliaire sont enregistrés. 10 brossages présentent une analyse du battement et un suivi de microbilles. 10 brossages sur des films déjà existants (étude rétrospective) sont inclus pour l'analyse de la trajectoire de la pointe des cils.

5.2 Influence des microbilles sur la fréquence de battement ciliaire

La fréquence de battement ciliaire, paramètre le plus simple à mesurer par FFT et vidéo-kymographie (voir méthodes en §4.2.2), est mesurée sur l'ensemble des 22 brossages "battants". L'ensemble de ces films est divisé en deux groupes : 264 films sont enregistrés avant ajout de microbilles et 391 films sont enregistrés après ajout de microbilles.
Avant ajout de microbilles, la FBC est mesurée dans un intervalle allant de 0,7 à 15,6 Hz (moyenne $= 6,4$ Hz, écart-type $= 2,9$ Hz). Après ajout de microbilles, la FBC varie de 0,9 à 15,1 Hz (moyenne $= 7,5$ Hz, écart-type $= 3,2$ Hz).
Pour évaluer l'influence des microbilles j'ai comparé la variation relative de la FBC, calculée patient par patient, en utilisant un test non paramétrique pour variables appariées (Test de Wilcoxon). La FBC moyenne après ajout est significativement ($p = 0,003$) augmentée de 15 % par rapport à la moyenne de la FBC avant ajout de microbilles (Fig. 5.2).

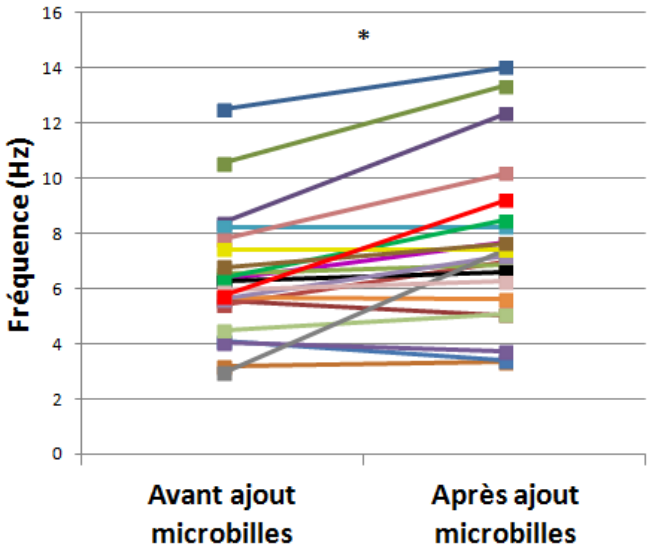


FIGURE 5.2 – **Effet de l'ajout de microbilles sur la fréquence de battement ciliaire**. Chaque trait représente, par patient, l'évolution de la FBC avant et après ajout de microbilles. Le * indique une différence significative ($p < 0,05$).

On voit donc ici que les microbilles ont une influence significative sur la FBC. Néanmoins cette influence étant faible, on considérera en première approximation que nos data obtenues en présence de microbilles peuvent être comparées avec celles de la littérature qui sont obtenues en absence de microbilles.

5.3 Paramètres du battement ciliaire

Ces paramètres sont mesurés sur les 10 brossages pour lesquels l'analyse du battement ciliaire et le suivi de microbilles sont disponibles.

Fréquence de battement ciliaire (FBC). La FBC varie de 3,6 à 15,0 Hz (avec une moyenne de 8,4 Hz et un écart-type de 3,7 Hz). Pour comparaison, [Papon et al., 2012] ont décrit, dans les mêmes conditions expérimentales, une FBC moyenne pour des patients "normaux" (ou du moins non-DCP) à 8,9 $\pm 0,7$ Hz. La comparaison avec les valeurs de la littérature [Chilvers and O'Callaghan, 2000] ne peut se faire directement à cause des différences dans le protocole de mesure. En effet, si nous filmons à température ambiante (environ 25°C), certaines équipes utilisent, lors de leurs enregistrements, un milieu contrôlé à 37°C. Or on sait que la température à un effet sur la fréquence [Green et al., 1995]. Ces auteurs ont décrit une diminution linéaire de la FBC chez 11 sujets sains lorsque l'on passe de 37°C (FBC $= 14,1$ Hz) à 25°C (FBC $= 9,5$ Hz). [Chilvers and O'Callaghan, 2000] ont décrit, chez 8 sujets sains, une FBC de 13,2 Hz à 37°C qui, si on utilise la même relation linéaire, correspondrait à une FBC d'environ 8,9 Hz à 25°C. Nos résultats de FBC sont donc en moyenne au niveau des FBC de la littérature décrivant une fréquence normale.

Amplitude du battement ciliaire (ABC). L'ABC est mesurée dans un intervalle allant de 4,0 à 8,8 µm (moyenne = 7,0 µm ; écart-type = 1,0 µm). Il existe peu de références donnant une valeur d'amplitude dans la littérature. [Papon et al., 2012] ont décrit chez des sujets "normaux" (non-DCP) une ABC de 7,6 $\pm$ 0,7 µm. Nos valeurs sont donc très proches. On peut aussi retrouver des valeurs d'amplitude similaires dans des modèles animaux à partir d'un calcul prenant en compte la longueur du cil et l'angle de battement : 9,8 µm sur de la trachée de lapin [Sanderson and Sleigh, 1981] et 7,0 µm sur de l'œsophage de grenouille[Gheber and Priel, 1997].

Longueur d'onde de l'onde métachrone (LOOM). La LOOM est mesurée dans un intervalle allant de 10,3 à 28,0 µm (moyenne = 14,2 µm ; écart-type = 4,2 µm). On peut noter que ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les LOOMs décrites sur des modèles animaux. [Machemer, 1972, Okamoto and Nakaka, 1994] ont mesuré une onde métachrone entre 11 et 14 µm chez la *paramécie*. [Sanderson and Sleigh, 1981] a observé une onde métachrone moyenne de 20 µm sur de la trachée de lapin, et enfin, [Gheber and Priel, 1994, Gheber and Priel, 1997] une onde de 5 à 13 µm sur de l'œsophage de grenouille en culture.

Densité relative de cils. La densité relative de cils est mesurée dans un intervalle allant de 0,58 à 0,98 (moyenne = 0,80 ; écart-type = 0,11). [Hill et al., 2010] ont décrit une densité de cils de 5 à 8 cils par μm^2. On peut, à partir d'un calcul simple, calculer l'aire couverte par les cils sur une vue en coupe (Figure 5.3). A partir de ces calculs, on trouve une densité de cils comprise entre 0,6 et 1,0. Nos valeurs de densité sont donc dans le même ordre de grandeur.

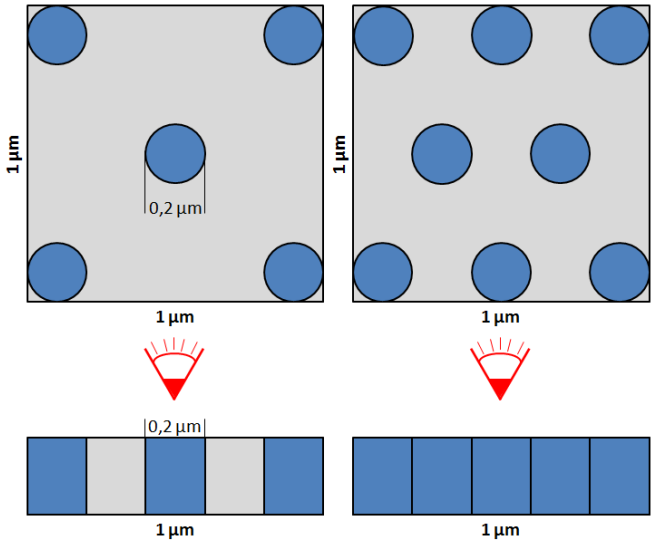
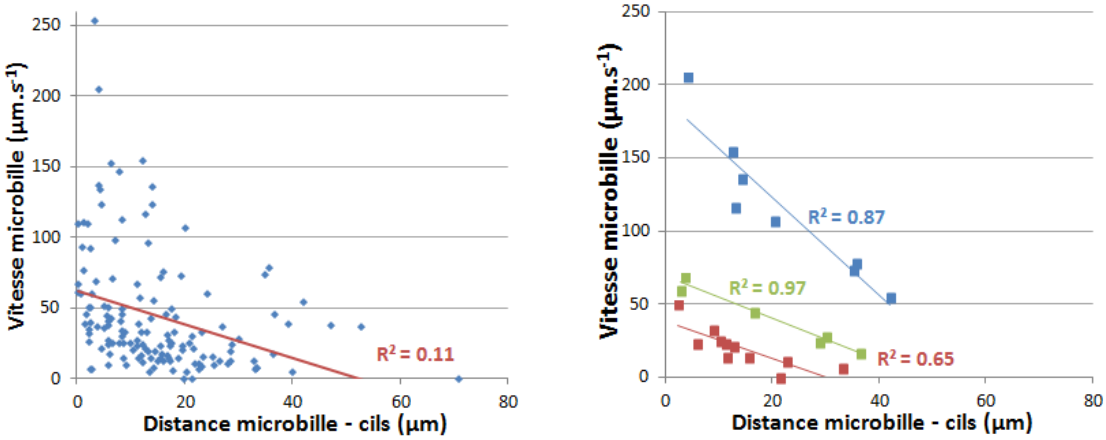


FIGURE 5.3 – **Simulation de la densité relative de cils**. Chaque cercle représente un cil de diamètre $e_c = 0,2$ µm. Schéma de la répartition des cils : en haut, vue du dessous, en bas vue en coupe longitudinal. Le point de vue est représenté par l'œil stylisé en rouge. A gauche, nous avons 5 cils/µm^2 et à droite 8 cils/µm^2 pour une densité respective de 0,6 et 1,0.

5.4 Ecoulement généré par le battement ciliaire

La méthode de suivi de microbilles permet de définir pour chaque microbille une vitesse moyenne U_b^* et une distance à la paroi ciliée moyenne L_b^* que nous appellerons dans la suite distance microbille-cils. La figure 5.4(a) présente la vitesse moyenne de l'ensemble des microbilles en fonction de la distance microbille-cils. La vitesse des microbilles varie de 0,0 à 253,8 µm.s^{-1} alors que la distance varie de 0,4 à 70,9 µm sans que l'on puisse établir une relation claire entre ces deux paramètres. Néanmoins, cette absence de relation entre vitesses des microbilles et distance microbille-cils ne semble plus être aussi évidente lorsque les data sont analysées bordure par bordure comme on peut le voir sur les 3 exemples de la figure 5.4(b). Sur ces exemples où FBC, ABC, LOOM et densité relative de cils sont fixes, la relation vitesse-distance semble beaucoup plus évidente avec une vitesse d'autant plus grande que la distance est petite. Devant ce constat nous avons effectué une analyse de régression multiple.



(a) Ensemble des data (22 bordures ciliées).

(b) Exemples de 3 bordures ciliées (bleu, vert et rouge).

FIGURE 5.4 – **Vitesse des microbilles en fonction de la distance microbille-cils**. Chaque carré correspond à une microbille mesurée le long de la bordure correspondante. Chaque ligne représente une régression linéaire (avec le coefficient de détermination R^2 correspondant).

5.5 Relation entre la vitesse des microbilles et les paramètres du battement ciliaire

Pour permettre de dégager une évolution de la vitesse moyenne des microbilles en fonction des paramètres du battement ciliaire, l'effet de chaque paramètre a été analysé en séparant les microbilles en 2 groupes à l'aide de la médiane du paramètre considéré. Un test non paramétrique de U de Mann-Whitney est utilisé pour la comparaison.

Effet de la distance microbille-cils (Fig. 5.5). On peut voir que la vitesse des microbilles est significativement plus grande lorsque la distance microbille-cil est inférieure à la valeur médiane de 12,3 µm. Au sein de ces 2 groupes il est intéressant de noter que les paramètres du battement ciliaire (FBC, ABC, LOOM et densité relative de cils) ne sont pas significativement différents (Fig. 5.6) ce qui confirme l'importance de l'effet "distance microbille-cils" sur la vitesse des microbilles.

Effet de la fréquence de battement ciliaire (Fig. 5.7). La valeur médiane de FBC est de 7,7 Hz. On peut voir que la vitesse moyenne des microbilles est significativement réduite lorsque la FBC est inférieure à 7,7 Hz. On peut noter que la distance microbille-cils, ainsi que les autres paramètres du battement ciliaire (ABC, LOOM et densité relative) ne sont pas significativement différents selon les 2 groupes de FBC (Fig. 5.8).
[Papon et al., 2012] ont montré qu'un seuil de 7,7 Hz permet de discriminer des sujets DCP et non-DCP avec une spécificité de 87 % et une sensibilité de 57 %. On peut donc voir ici que des patients considérés comme DCP à partir du seuil décrit par Papon et coll. auraient une vitesse moyenne de microbilles (c.a.d. une efficacité de l'épuration mucociliaire) diminuée par rapport aux sujets non-DCP.

Effet de l'amplitude du battement ciliaire (Fig. 5.9). La valeur médiane de l'ABC est de 7,0 µm. Aucune différence significative de vitesse entre les 2 groupes de FBC n'est observée. Les autres paramètres du battement ciliaire (FBC, LOOM et densité relative des cils) ainsi que la distance microbille-cils ne sont pas différents en fonction des groupes d'ABC (Fig. 5.10).
En comparant avec les valeurs de littérature, [Papon et al., 2012] utilisaient un seuil de 5,9 µm pour discriminer les sujets DCP et non-DCP. L'absence de différences significatives est cohérente avec le fait que l'ensemble des valeurs d'ABC parait normal au vu de la valeur du seuil décrit par Papon et coll.. En d'autres termes on peut supposer que la gamme d'ABC explorée dans notre étude est 1/ dans une gamme physiologique et 2/ suffisamment peu étendue pour qu'elle n'induise pas de variations significatives de la vitesse des microbilles et donc de l'efficacité de l'épuration mucociliaire.

Effet de la densité relative de cils (Fig. 5.11). La vitesse moyenne des microbilles est reportée pour 2 différents groupes, de part et d'autre de la médiane de la densité de cils (égale à 0,8). La vitesse moyenne des microbilles est trouvée significativement réduite pour le groupe où la densité relative de cils est la plus faible. Intuitivement ce résultats était attendu ; il semble logique que le nombre de cils, qui individuellement peuvent être vus chacun comme un moteur, modifie l'amplitude du flux. La FBC (Fig. 5.12(a)), l'ABC (Fig. 5.12(b)) ainsi que la distance microbille-cils (Fig 5.12(d)) ne sont pas affectés par la densité relative de cils. Par contre, la LOOM est significativement plus petite lorsque la densité relative de cils est diminuée (Fig. 5.12(c)) : 12,1 µm (densité $\leq 0,8$) contre 15,4 µm (densité $> 0,8$). Cette dernière relation est un peu difficile à expliquer. Néanmoins des expériences sur des modèles cellulaires (sur une algue à double flagelle *Chlamydomonas reinhardtii* et sur des couples de cellules isolées d'algue multicellulaire *Volvox carteri*) tendent à montrer que la synchronisation entre deux flagelles se produit grâce à la réponse élastique du flagelle à la contrainte de cisaillement [Brumley et al., 2015]. Ce qui signifie que deux flagelles peuvent synchroniser leurs battements au travers des interactions hydrodynamiques directes. On pourrait donc supposer qu'à faible densité la coordination va être modifiée ce qui pourrait se traduire par une LOOM réduite.

Effet de la longueur d'onde de l'onde métachrone (Fig. 5.13). La vitesse moyenne des microbilles est reportée pour 2 différents groupes, de part et d'autre de la médiane de la LOOM égale à 12,1 µm. La vitesse moyenne des microbilles est trouvée significativement réduite dans le groupe LOOM $\leq 12,1$ µm. La FBC (Fig. 5.14(a)), l'ABC (Fig. 5.14(b)) et la distance microbille-cils (Fig. 5.14(d)) ne sont pas différents entre les 2 groupes de LOOM. La densité relative de cils est significativement augmentée lorsque la LOOM est augmentée (Fig. 5.14(c)) : 0,72 (LOOM $\leq 12,1$ µm) contre 0,82 (LOOM $> 12,1$ µm). L'absence de corrélation entre la vitesse des microbilles et la LOOM (Tableau 5.2) associée à ce dernier résultat suggère que la variation significative de vitesse observée entre les 2 groupes de LOOM pourrait être due, non pas à la LOOM, mais plutôt à la densité relative de cils qui dans certaines conditions conditionnerait la valeur de LOOM. En d'autres termes, la LOOM apparaitrait comme un paramètre dépendant de la densité de cils.

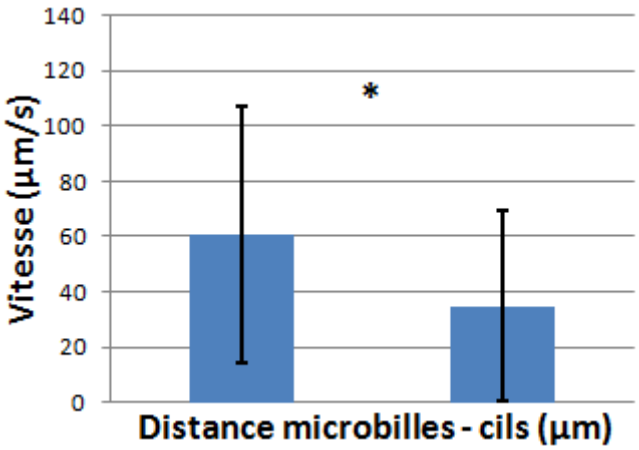
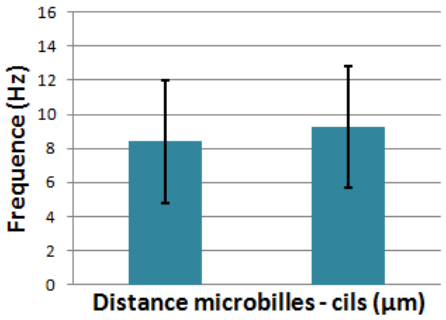
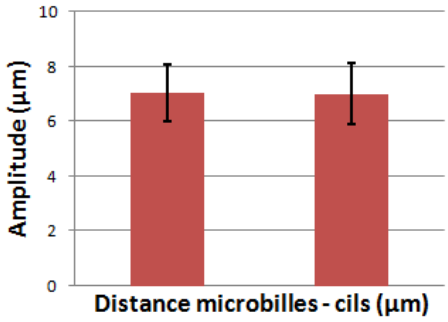


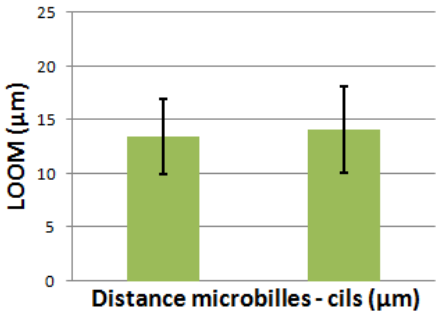
FIGURE 5.5 – **Vitesse des microbilles en fonction de la distance**. Les microbilles sont présentées en 2 groupes en fonction de la valeur médiane de la distance microbille-cils. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type. Le * indique une différence significative de vitesse ($p < 0,05$).



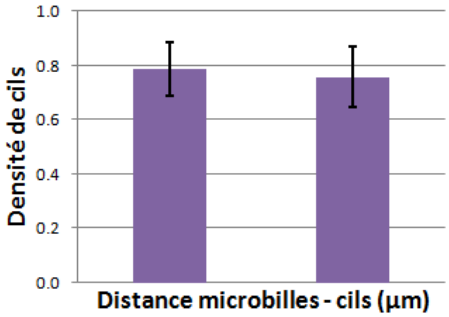
(a) FBC mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la distance microbille-cils.



(b) ABC mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la distance microbille-cils.



(c) LOOM mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la distance microbille-cils.



(d) Densité relative mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la distance microbille-cils.

FIGURE 5.6 – **Comparaison entre la distance microbille-cils et les paramètres du battement ciliaire**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type.

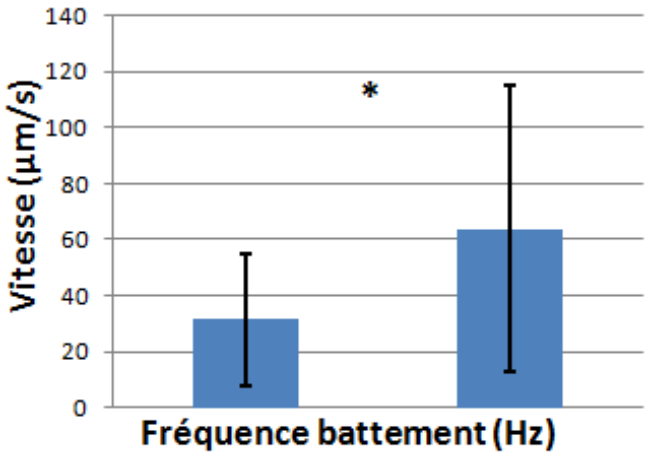
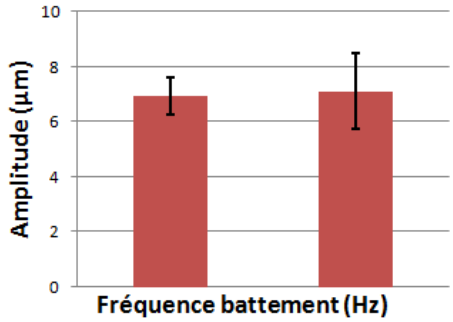
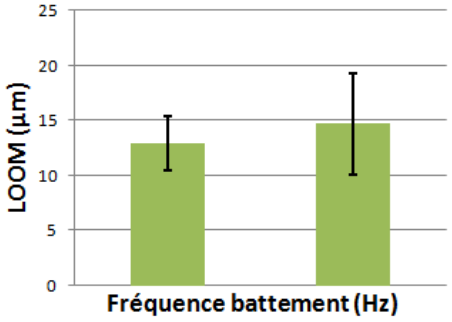


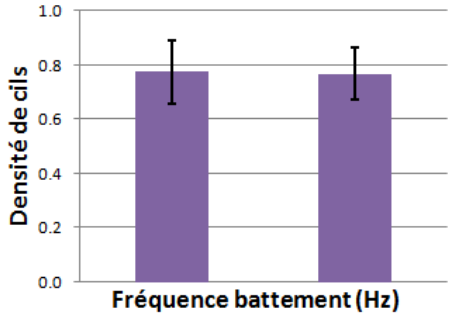
FIGURE 5.7 – **Comparaison de la vitesse des microbilles en fonction de la fréquence de battement ciliaire**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type. Le * indique une différence significative de vitesse ($p < 0,05$).



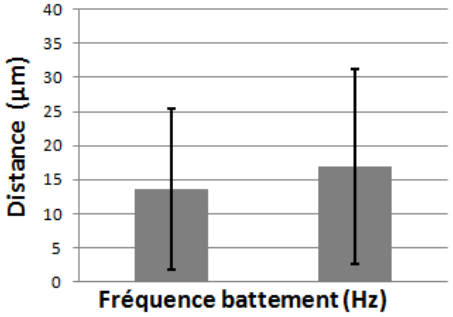
(a) ABC mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la fréquence de battement ciliaire.



(b) LOOM mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la fréquence de battement ciliaire.



(c) Densité relative mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la fréquence de battement ciliaire.



(d) Distance microbille-cils mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la fréquence de battement ciliaire.

FIGURE 5.8 – **Comparaison entre la fréquence de battement ciliaire et les autres paramètres du battement ciliaire**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type. Le * indique une différence significative de vitesse ($p < 0,05$).

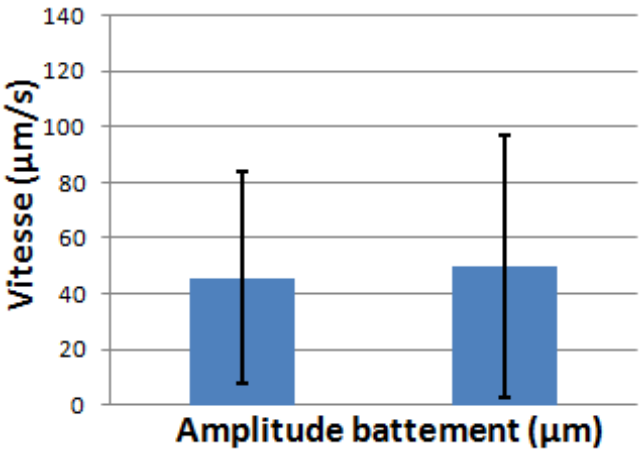
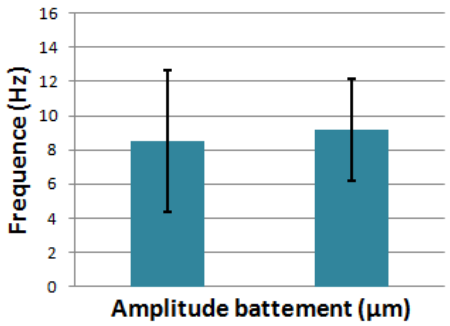
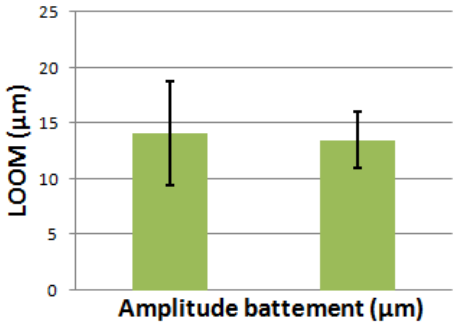


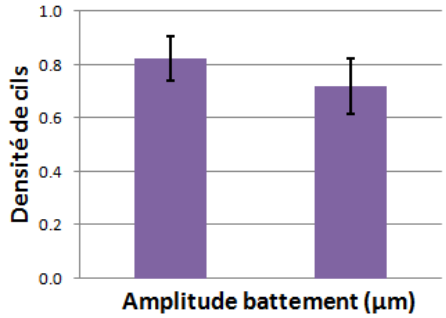
FIGURE 5.9 – **Comparaison de la vitesse des microbilles en fonction de l'amplitude de battement ciliaire**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type. Le * indique une différence significative de vitesse ($p < 0,05$).



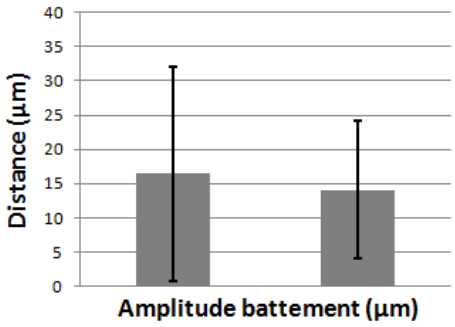
(a) FBC mesurée pour 2 différents groupes en fonction de l'amplitude de battement ciliaire.



(b) LOOM mesurée pour 2 différents groupes en fonction de l'amplitude de battement ciliaire.



(c) Densité relative mesurée pour 2 différents groupes en fonction de l'amplitude de battement ciliaire.



(d) Distance microbille-cils mesurée pour 2 différents groupes en fonction de l'amplitude de battement ciliaire.

FIGURE 5.10 – **Comparaison entre l'amplitude de battement ciliaire et les autres paramètres du battement ciliaire**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type.

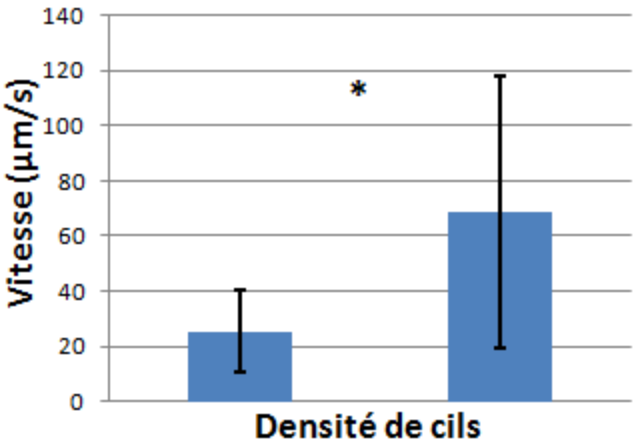
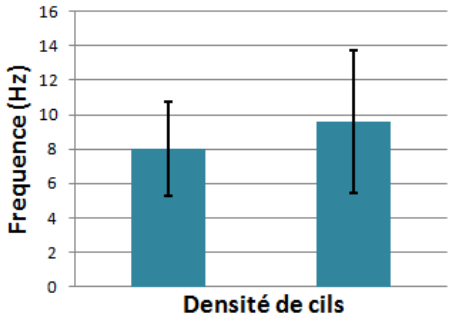
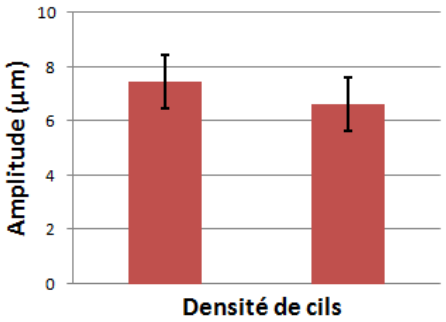


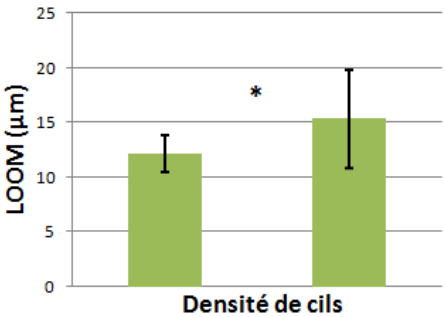
FIGURE 5.11 – **Comparaison de la vitesse des microbilles en fonction de la densité relative de cils**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type. Le * indique une différence significative de vitesse ($p < 0,05$).



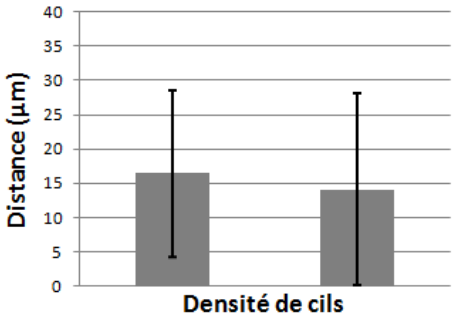
(a) FBC mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la densité relative de cils.



(b) ABC mesurée pour 2 différents groupes en fonctionde la densité relative de cils.



(c) LOOM mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la densité relative de cils.



(d) Distance microbille-cils mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la LOOMla densité relative de cils.

FIGURE 5.12 – **Comparaison entre la densité relative de cils et les autres paramètres du battement ciliaire**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type. Le * indique une différence significative de vitesse ($p < 0,05$).

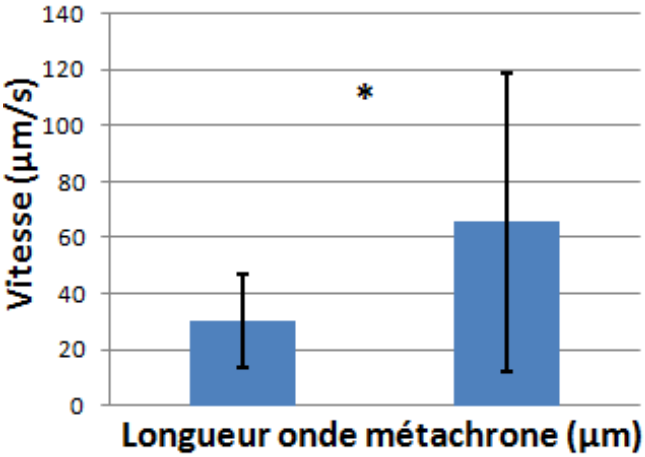
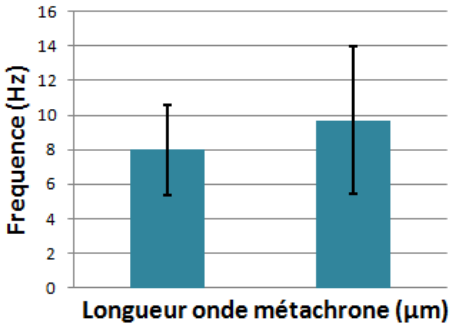
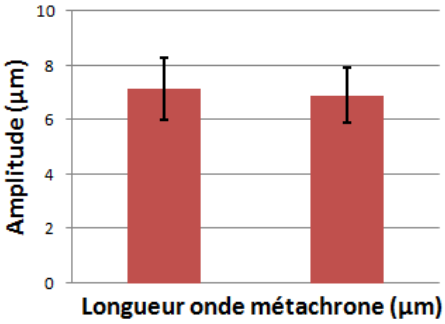


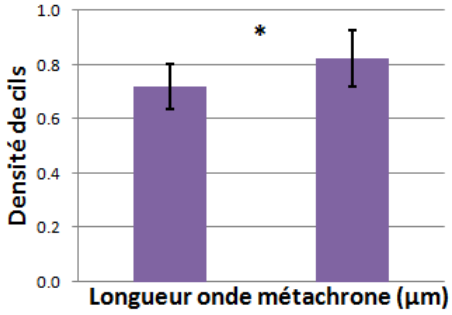
FIGURE 5.13 – **Comparaison de la vitesse des microbilles en fonction de la longueur d'onde de l'onde métachrone**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type. Le * indique une différence significative de vitesse ($p < 0,05$).



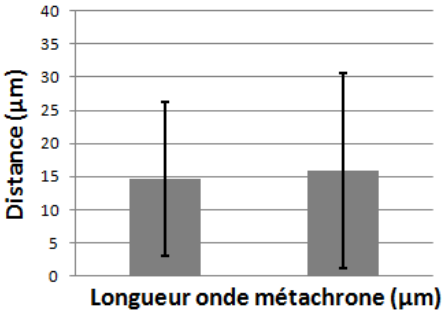
(a) FBC mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la LOOM.



(b) ABC mesurée pour 2 différents groupes en fonctionde la LOOM.



(c) Densité relative mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la LOOM.



(d) Distance microbille-cils mesurée pour 2 différents groupes en fonction de la LOOM.

FIGURE 5.14 – **Comparaison entre la longueur d'onde de l'onde métachrone et les autres paramètres du battement ciliaire**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'erreur type. Le * indique une différence significative de vitesse ($p < 0,05$).

Afin de définir les paramètres indépendants influançant la vitesse de microbilles, nous avons réalisé une régression multiple pas à pas. Cette régression nous permet de calculer le poids de chacun des paramètres sur la vitesse des microbilles. Dans l'ordre, la FBC, la densité relative de cil, l'ABC et la distance microbilles-cils sont les paramètres qui influent sur la vitesse des microbilles. Cette régression pas à pas montre que la LOOM n'est pas un paramètre indépendant influençant la vitesse des microbilles (tableau 5.1).

TABLEAU 5.1 – **Synthèse de la régression multiple pas à pas entre la variable vitesse des microbilles et les paramètres du battement ciliaire**.

Variables	**Étape**	**Niveau** p
FBC	1	$\leq 10^{-6}$
Densité relative	2	$\leq 10^{-6}$
ABC	3	$\leq 10^{-6}$
Distance microbille-cils	4	$\leq 10^{-6}$
LOOM	5	0,21

$n = 128$. La couleur rouge indique la significativité.

A partir de ces résultats, une analyse de régression multiple (voir tableau 5.2) a été faite entre la variable dépendante vitesse des microbilles et les 4 variables indépendantes (FBC,densité relative de cils, ABC et distance microbille-cils).

TABLEAU 5.2 – **Synthèse de la régression multiple entre la variable vitesse des microbilles et les paramètres du battement ciliaire**.

Variables indépendantes	**Niveau** p
FBC	$\leq 10^{-6}$
ABC	$\leq 10^{-6}$
Densité relative	$\leq 10^{-6}$
Distance microbille-cils	$\leq 10^{-6}$

$n = 128; R = 0,825; R^2 = 0,681; R^2$ ajusté $= 0,671$. La couleur rouge indique la significativité.

L'analyse de régression multiple indique une corrélation très significative entre la vitesse des microbilles et 4 paramètres (FBC, ABC, densité relative de cils et distance microbille-cils) : pour chacun de ces paramètres, le test F donne une probabilité très significative ($p < 10^{-6}$). Il est intéressant de noter que la régression multiple nous permet d'obtenir une loi qui relie la vitesse des microbilles aux paramètres du battement ciliaire tel que :

$$\text{Vitesse} = (6,61 \times \text{FBC}) + (220,14 \times \text{densité}) + (16,08 \times \text{ABC}) - (1,01 \times \text{distance}) - 277,78 \quad (5.1)$$

5.6 Trajectoire de l'extrémité des cils

Ici, je me suis intéressé à la trajectoire complète de l'extrémité des cils dans le but de choisir et/ou de justifier un certain nombre de paramètres utilisés dans le modèle numérique que je propose au §6. Le modèle ayant pour but de simuler l'effet de cils battants, je me suis restreint à décrire la trajectoire de cils ayant un battement "normal". De plus, pour cette étude et comme indiqué en §4.3.3, j'avais besoin de cellules ciliées de patients filmées avec un objectif ×100 afin d'augmenter la précision de l'analyse. J'ai donc sélectionné 10 films enregistrés sur 10 patients issus de la base de données "contrôle non-DCP" de l'étude de [Papon et al., 2012].

Les trajectoires sont définies par l'évolution temporelle du couple (X', Z') où X' est la distance entre la pointe du cil et la normale passant par la base et Z' est la hauteur de la pointe du cil par rapport à la base. De manière évidente ces trajectoires dépendent : 1/ de la longueur du cil qui n'est pas toujours la même et 2/ de la fréquence du battement ciliaire qui est également différente en fonction du cil considéré. Aussi dans le but d'obtenir une trajectoire "cadre", j'ai imaginé une normalisation spatiale et une normalisation temporelle.

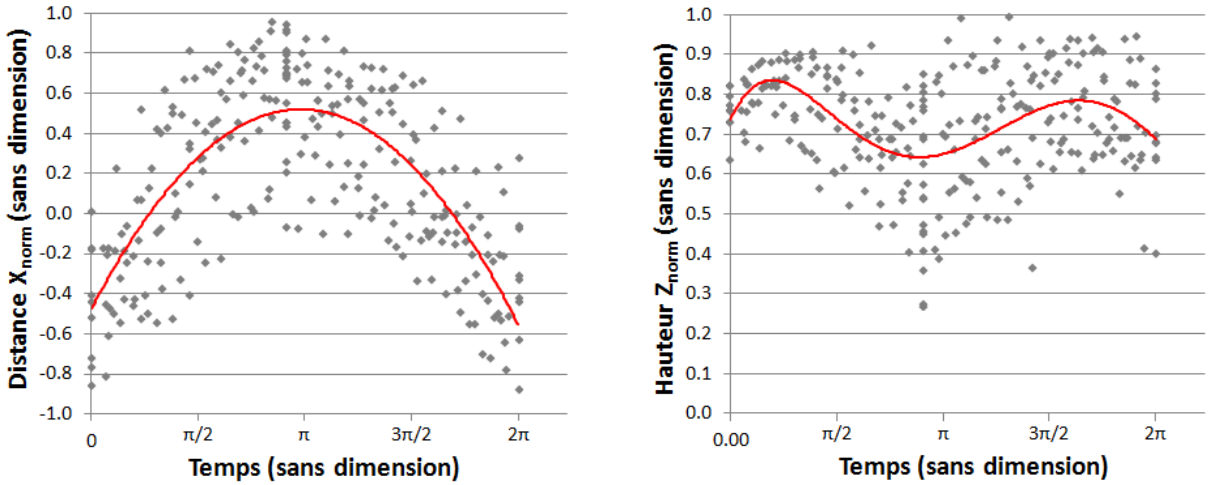
Normalisation spatiale. La taille du cil, L_c, est mesurée en calculant la distance entre la base et la pointe du cil juste avant que la phase retour ne commence. Elle est en moyenne de 5,9 µm avec un écart-type de 1,3 µm. Afin de normaliser nos trajectoires, on définit, que la longueur L_c de chaque cil est égale à 1. L'ensemble de la trajectoire est recalculée au travers des paramètres normalisés $X_{\text{norm}}, Z_{\text{norm}}$:

$$X_{\text{norm}} = \frac{X'}{L_c} \qquad \text{et} \qquad Z_{\text{norm}} = \frac{Z'}{L_c} \tag{5.2}$$

Normalisation temporelle. La FBC des 10 cils considérés varie de 7,3 à 14,8 Hz. La durée du cycle varie donc du simple au double. Aussi, j'ai normalisé le temps en considérant que pour chaque cil la durée du cycle était de 2π. De plus, comme il est généralement reconnu que la phase aller dure moins de temps que la phase retour [Sleigh et al., 1988], j'ai fixé la durée de la phase aller à 45% × 2π et celle de la phase retour à 55% × 2π. En d'autre termes si on considère que la phase aller est enregistré entre les images 1 et n_a alors que la phase retour est enregistrée entres les images n_a et n_t, le jeu de coordonnées ($X_{\text{norm}}, Z_{\text{norm}}$) enregistré sur l'image n est associé au temps normalisé t_{norm}

$$\begin{cases} t_{\text{norm}} &= \dfrac{n-1}{n_a-1}(0,45 \times 2\pi) & \text{si } n \leq n_a \\ t_{\text{norm}} &= (0.45 \times 2\pi) + \dfrac{n-n_a-1}{n_t-n_a-1}(0,55 \times 2\pi) & \text{si } n > n_a \end{cases} \tag{5.3}$$

Modélisation de la trajectoire. Les variables X_{norm} et Z_{norm} sont représentées en fonction du temps t_{norm} (Fig. 5.15).



(a) Evolution de X_{norm} (distance entre la pointe du cil et la normale passant par la base) au cours du temps. La courbe rouge représente la regression parabolique $R^2 = 0,55$.

(b) Evolution de Z_{norm} (hauteur de la pointe du cil par rapport à la base) au cours du temps. La courbe rouge représente la regression polynomiale $R^2 = 0,18$.

FIGURE 5.15 – **Evolution des coordonnées sans dimension de l'extrémité d'un cil au cours d'une période de battement**.

Si on assimile l'évolution temporelle respectivement de X_{norm} à une parabole en t et de Z_{norm} à une fonction polynomiale d'ordre 5 en t, les équations des régressions sont :

$$\begin{cases} X_{\text{norm}} & = \zeta_1\ t_{\text{norm}}^2 + \zeta_2\ t_{\text{norm}} + \zeta_3 \\ Y_{\text{norm}} & = \varpi_1\ t_{\text{norm}}^5 + \varpi_2\ t_{\text{norm}}^4 + \varpi_3\ t_{\text{norm}}^3 + \varpi_4\ t_{\text{norm}}^2 + \varpi_5\ t_{\text{norm}} + \varpi_6 \end{cases} \tag{5.4}$$

$$\text{avec} \begin{cases} \zeta_1 & = -1,05 \times 10^{-1} \\ \zeta_2 & = 6,45 \times 10^{-1} \\ \zeta_3 & = 4,74 \times 10^{-1} \end{cases} \quad \text{et} \begin{cases} \varpi_1 & = 1,10 \times 10^{-3} \\ \varpi_2 & = -2,21 \times 10^{-2} \\ \varpi_3 & = 1,54 \times 10^{-1} \\ \varpi_4 & = -4,25 \times 10^{-1} \\ \varpi_5 & = 3,69 \times 10^{-1} \\ \varpi_6 & = 7,36 \times 10^{-1} \end{cases}$$

Cette double modélisation de X_{norm} et Z_{norm} nous permet de construire une trajectoire "cadre" de la pointe d'un cil au cours d'un cycle de battement (Fig. 5.16).

Si l'on analyse le modèle de trajectoire, l'amplitude de battement ciliaire correspond à $0,99L_c$ et la variation de la hauteur de la pointe du cil au cours d'un cycle est de $0,19L_c$. Si l'on considère que la taille moyen d'un cil respiratoire normal dans la littérature est de 6 µm [Leopold et al., 2009], alors l'ABC extraite du modèle de trajectoire est de 5,9 µm et la variation de hauteur de la pointe du cil extraite du modèle de trajectoire est de 1,1 µm. Cette faible

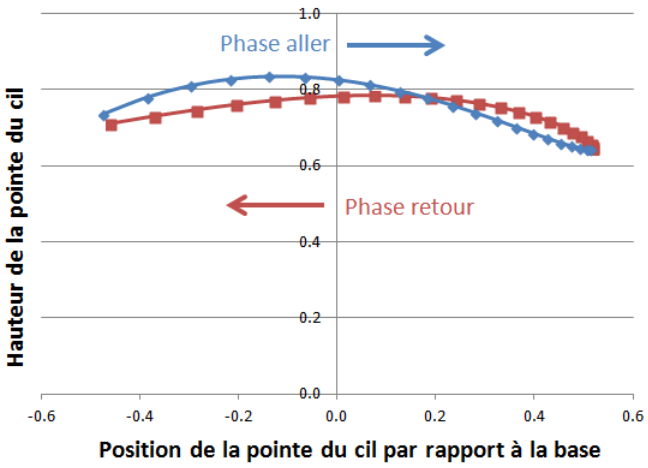
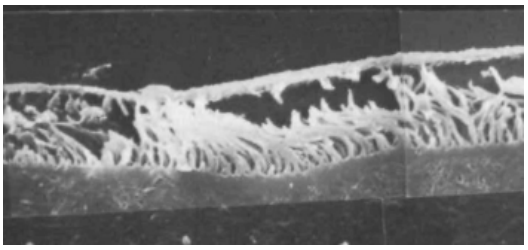
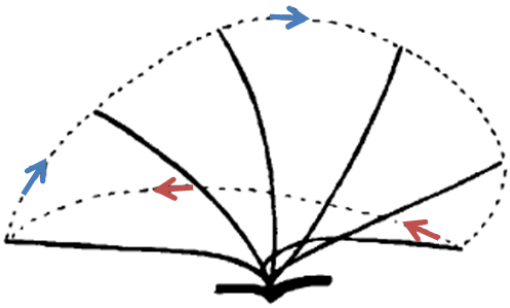


FIGURE 5.16 – **Modélisation de la trajectoire du cil durant un cycle de battement**. La hauteur de la pointe du cil (sans dimension) est tracée en fonction de la distance entre la pointe du cil et la normale passant par la base du cil (sans dimension). Le sens du trajet est indiqué par les flèches. La phase aller est en bleu et la phase retour en rouge.

variation de hauteur ($\simeq 20\%$) est à priori un peu surprenante lorsque l'on la compare avec les descriptions schématiques ou les vues en coupe de microscopie électronique de la littérature. Ainsi par exemple les schémas et vues en coupe effectuées par microscopie eléctronique donnés par [Sanderson and Sleigh, 1981] ou [Sleigh et al., 1988] (voir figures 5.17(a), 5.17(b) et 2.3(a)) laissent suggérer une variation de hauteur entre 50 et 70%. Néanmoins le fait est que la profondeur de pénétration du cil dans le mucus donnée par ces mêmes auteurs est de 0,5 µm et le ressenti des cliniciens spécialistes du diagnostic de la DCP est plutôt en faveur de l'amplitude de notre description.



(a) Coupe d'épithélium de lapin en microscopie electronique [Sanderson and Sleigh, 1981].



(b) Schéma de la trajectoire du cil durant un cycle de battement. Modifié d'après [Sleigh et al., 1988]. Le mouvement aller est représenté par les flèches bleues et le mouvement retour par les flèches rouges.

FIGURE 5.17 – **Variations de la hauteur de la pointe du cil dans le littérature**.

Il est à noter que cette trajectoire "cadre" si elle est associée à une longueur de cil de 6 µm et à la fréquence moyenne des 10 bordures nous donne des valeurs (angle, la distance parcourue par la pointe du cil par seconde, aire balayée par le cil par seconde,...) qui sont systématiquement au dessus des valeurs seuils permettant de discriminer un battement DCP d'un battement "non malade" [Papon et al., 2012].

5.7 Cultures primaires de CENH

Je me suis intéressé aux cultures de CENH dans le but d'évaluer la force exercée par les cils par microscopie à force atomique (AFM). Ceci ne pouvait pas être réalisé avec les brossages en suspension dans la mesure où la technique d'AFM implique des échantillons adhérents à un substrat. Néanmoins concernant ces cultures de nombreuses difficultés ont du être surmontées au cours de cette thèse afin d'obtenir un épithélium différencié utilisable. Les 2 principaux soucis liés à la culture sont : premièrement le nombre de cellules exploitables lors de la phase de mise en culture et deuxièmement la différenciation cellulaire. J'ai pu mettre en culture lors de cette thèse 115 prélèvements provenant de patients opérés de polyposes.

5.7.1 Nombre de cellules exploitables

Lors de la phase de mise en culture, j'ensemence les puits Transwell avec 1 million de cellules par puits. Sur les 115 prélèvements, j'ai obtenu, en moyenne, 7,3 puits par prélèvement, soit 7,3 millions de cellules. La médiane du nombre de puits est de 6,0 puits et l'écart-type de 5,5 puits. La plus petite culture comptait 1 puits alors que la plus volumineuse en comptait 30. Afin d'obtenir des cultures plus volumineuses en nombre de puits, j'ai pu tester différentes stratégies. Il semblerait que l'ajout d'une stimulation mécanique (agitation) du tube contenant les polypes et la protéase le soir de l'étape de mise en pronase améliore le détachement cellulaire et au final le nombre de puits lors de la mise en culture. Cette hypothèse reste encore à confirmer sur le long terme.

5.7.2 Amélioration de la différenciation

Malgré le grand nombre de cultures, je n'ai que très peu souvent observé des cultures bien différenciées regroupant un grand nombre de cellules ciliées. La grande majorité des cultures, quand nous n'avions pas une absence complète de cils, ne présentaient que des "touffes" de cellules ciliées au bout de 14 jours de culture décrit comme étant le pic de différenciation de l'épithélium en culture (Fig. 5.18)

De plus, le battement ciliaire de ces touffes de cils ne semblait pas normal. J'ai pu mesurer la fréquence de battement ciliaire par les techniques des mesures de fréquences décrites précédemment (§4.2.2). La fréquence moyenne sur 11 cultures (pour 217 films) était de 4,4 Hz avec un écart-type de 1,4 Hz.

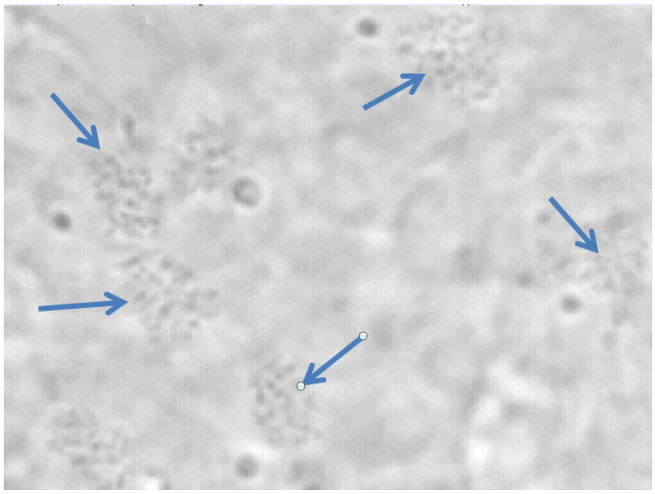
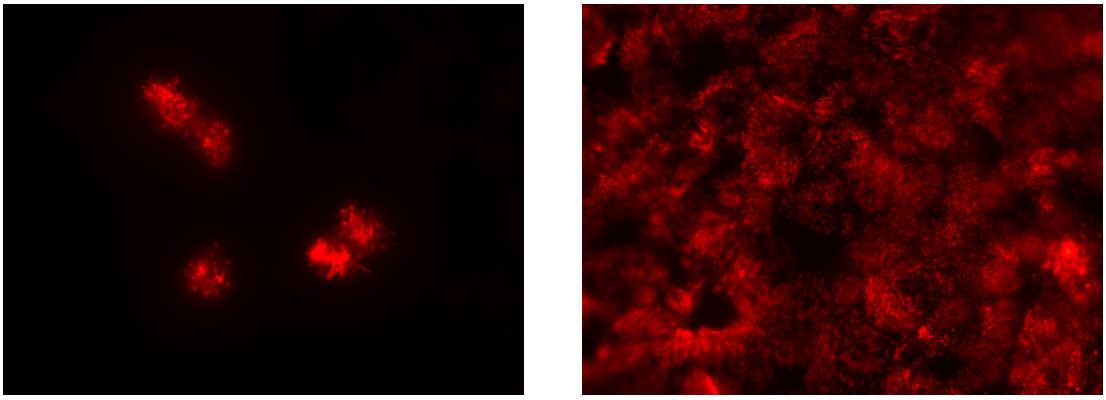


FIGURE 5.18 – **Exemple de culture de CENH peu différenciée**. Culture en Ultroser-G après 14 jours d'incubation. Les flèches bleus représentent l'emplacement des cellules ciliées (*Objectif* ×40).

J'ai donc décidé de tester le milieu PneumaCult™-ALI commercialisé par StemCell Technologies censé permettre une différenciation de cellules bronchiques en épithélium cilié. Selon le fabricant, le pic de différenciation intervient au bout de 21 jours en interface air liquide avec ce milieu. Afin de comparer et de confirmer cette meilleure différenciation, j'ai marqué l'α-tubuline sur quelques cultures en fonction du milieu utilisé. En quelques mots, après différenciation, les puits de culture sont fixés avec du PFA (paraformaldéhyde, Sigma). Le tapis cellulaire est perméabilisé avec du Triton™ X-100 (Sigma) puis les sites non spécifiques sont saturés avec une solution de Régilait. 200 µl d'anticorps primaire de souris anti α-tubuline acétylés (Abcam plc Cambridge) sont déposés dans le puits pendant 30 min à température ambiante puis rincés 3 fois. par la suite, 200 µl d'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à Alexa Fluor 488 sont appliqués (Life technologies) dans l'obscurité. Les membranes des puits sont découpées au scalpel et montées sur des lames avec une goutte de ProLong™ Antifade (Life technologies) afin de prolonger la fluorescence. Les lames sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière avant d'être observées par microscope à fluorescence Axiovert-200M (Carl Zeiss) muni d'une caméra numérique (Axiocam MRM, Carl Zeiss) à l'aide du logiciel Axiovision (Carl Zeiss). Comme on peut le voir sur la figure 5.19, la différenciation en cellules ciliées est bien meilleure avec le milieu PneumaCult™-ALI avec une couverture de l'ensemble de la culture par des cellules ciliées.

Enfin l'amélioration de la différenciation, en plus de se traduire par une plus grande quantité de cils, semble se traduire par un meilleur battement. La FBC moyenne, mesurée sur les "touffes ciliées" de culture en Ultroser-G après 14 jours de différenciations est de 4,4 Hz (avec un écart-type de 1,4 Hz) alors que la FBC sur puits après 21 jours en PneumaCult™-ALI est de 7,4 Hz (avec un écart-type de 1,2 Hz). Le faible nombre de puits différenciés ne permet pas d'établir une significativité, mais l'on peut tout de même noter que la FBC de ces cultures est à la fois proche des valeurs normales décrites sur brossages [Papon et al., 2012] ainsi que sur les cultures de cellules bronchiques, par l'équipe de référence [Sears et al., 2015] (à température ambiante).



(a) Différenciation en milieu Ultroser-G après 14 jours de culture

(b) Différenciation en milieu PneumaCult™-ALI après 21 jours de culture

FIGURE 5.19 – **Exemple de marquages de la différenciation des cultures primaires de CENH en fonction du milieu utilisé**. Marquage rouge de l'α-tubuline, protéine constitutive des microtubules des cils. Il s'agit de la même culture, un puits est cultivé en Ultroser-G pendant 14 jours et le second en PneumaCult™-ALI pendant 21 jours avant marquage. (*Objectif* $\times 100$)

5.8 Résultats préliminaires de l'évaluation de la force exercée par les cils en AFM

Comme mentionné dans la partie précédente, les difficultés rencontrées lors de la mise en place de la culture cellulaire ne m'ont pas permis de mener une étude complète de mesure de force. Les résultats présentés ici correspondent donc à des expérimentations préliminaires visant à mettre au point un protocole de mesure reproductible. 5 cultures différentes ont été inclues dans cette étude (1 puits par culture). Ces 5 puits ont été sélectionnés en raison d'une bonne différenciation ciliaire après 21 jours de culture en milieu PneumaCult™-ALI. Sur ces 5 puits, 4 ont servi pour le test de différentes techniques de fixation de la membrane poreuse au fond de la boite de Pétri ou pour des tests d'enregistrement de la déflexion du cantilever à diverses hauteurs par rapport à la surface cellulaire. Les données recueillies lors de ces tests ne sont donc pas directement exploitables même s'ils m'ont permit de définir les conditions de l'expérience décrite en §4.5). Je présente ici, les résultats obtenues sur le puits restant.

J'ai dans un premier temps enregistrés plusieurs films en VMHV sur ce puits de culture (Fig. 5.20) afin d'extraire la FBC. La FBC était de 8,4 Hz (avec un écart-type de 0,8 Hz).

Pour ce puits, la première étape à consister à définir la hauteur de la paroi cellulaire afin de fixer le $z = 0$ relatif (Fig. 5.21). Nous avons ensuite mesurer la déflexion du cantilever aux 2 différentes altitudes ($z = 7$ µm, $z = 200$ µm). J'ai enregistré cette série de mesures pour 2 positions différentes pendant 8 secondes à une fréquence d'échantillonnage de 1 kHz.

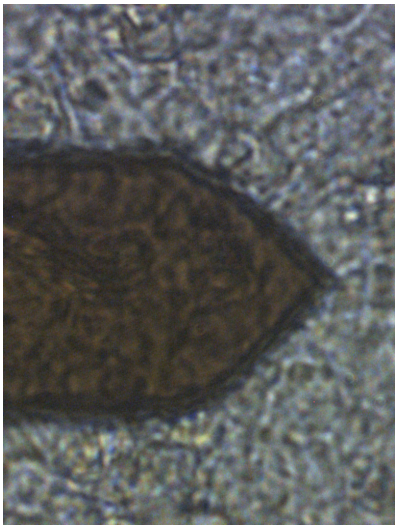


FIGURE 5.20 – **Approche du cantilever sur une culture de CENH**. Les cils correspondent aux striures noires. Le cantilever, légèrement transparent, correspond à la forme sombre (*Objectif* ×40)

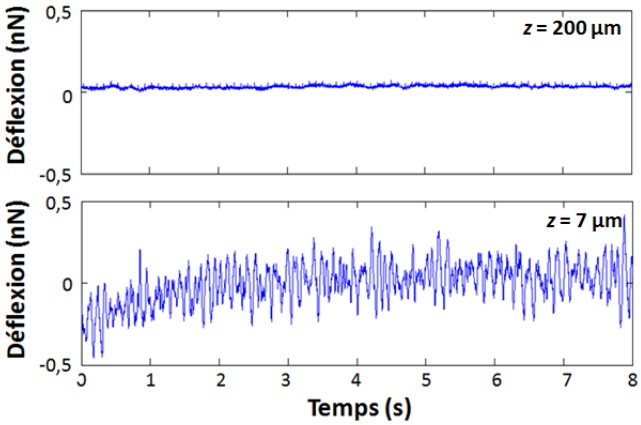


FIGURE 5.21 – **Exemple de signaux de déflexion du cantilever en fonction du temps**. Pour une même position, le signal est enregistré en haut et en bas, respectivement à 200 µm et 7 µm, au dessus du niveau de la paroi cellulaire.

On peut noter que les signaux à proximité des cils ont une amplitude de l'ordre de quelques centaines de picoNewton alors que les signaux enregistrés dans le milieu à haute altitude sont bien plus plat. On peut donc penser que la variation de déflexion du cantilever est causée par les cils. Comme proposé par [Teff et al., 2007], afin de s'assurer de la contribution du battement ciliaire dans la déflexion du cantilever, on peut analyser le domaine fréquentiel des signaux de déflexion, afin de voir si la FBC peut être extraite. Je me suis cantonner ici à une fréquence comprise entre 1 et 25 Hz, on peut estimer qu'en dehors de cette gamme de valeur, la fréquence ne correspond pas au battement ciliaire. Je peux donc comparer, en figure 5.22, le domaine fréquentiel des signaux présentés en figure 5.21. je ren Afin d'automatiser l'analyse des signaux de déflexion, j'ai crée une fonction, sous la plateforme Matlab, qui convertit automatiquement les signaux en spectre fréquentiel, recherche les pics de fréquence et sauve dans une base de données la valeur de ces pics (en Hz) et leurs amplitudes (en nN).

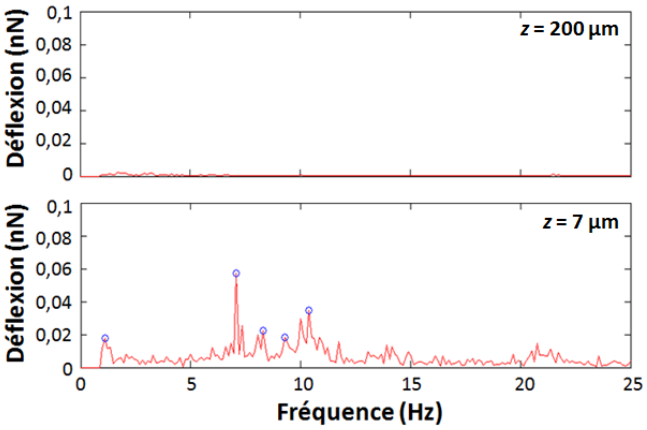
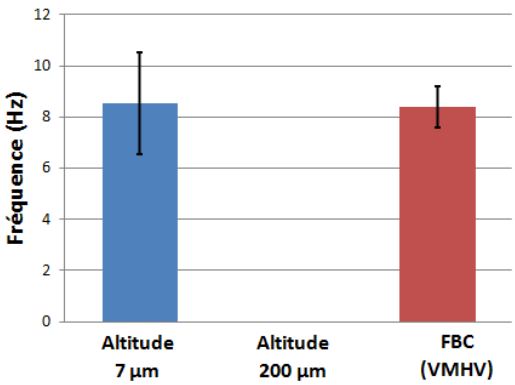


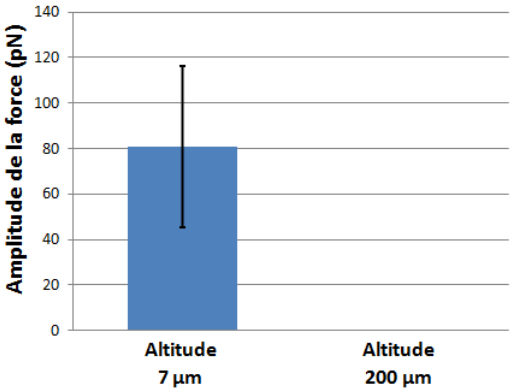
FIGURE 5.22 – **Exemple du spectre fréquentiel de signaux de déflexion du cantilever en fonction du temps**. Pour une même position, le signal est enregistré en haut et en bas, respectivement à 200 µm et 7 µm, au dessus du niveau de la paroi cellulaire. Les cercles bleus correspondent aux pics de fréquence détectés automatiquement, le pic le plus haut correspond à une fréquence de 7,2 Hz. Sur ce puits, la FBC correspondante est de $8,4 \pm 0,8$ Hz.

5.8.1 Analyse des signaux de déflexion

Je peux tout d'abord comparer la fréquence fondamentale détectée au sein des signaux de déflexion avec la FBC déterminée à partir des films enregistrés en VMHV (Fig. 5.23(a)). On peut voir qu'à une altitude z de 7 µm, la fréquence observée via l'AFM est proche de de celle obtenue par VMHV (respectivement, 8,5 Hz et 8,4 Hz). Enfin, on peut comparer l'amplitude des forces détectées pour chacun des pics en fonction de l'altitude z (Fig. 5.23(b)).



(a) Fréquences fondamentales détectées via l'AFM (en bleu) et par VMHV (en rouge).



(b) Amplitude de la force observée pour la fréquence fondamentale en fonction de l'altitude z

FIGURE 5.23 – **Fréquence fondamentale et force correspondante extraite des signaux d'AFM en fonction de l'altitude z du cantilever**. Les barres représentent la moyenne et les barres d'erreurs l'écart-type.

5.8.2 Extraction de la force générée par les cils

La force détectée par le cantilever correspond à la composante normale F_n de la force horizontale F_h développée par les cils. Sachant que l'on connait l'angle χ que le cantilever fait avec la surface cellulaire, on peut calculer à partir d'un calcul trigonométrique simple, l'ordre de grandeur de la force F_h (Fig. 5.24) :

$$sin(\chi) = \frac{F_n}{F_h} \qquad \Rightarrow \qquad F_h = \frac{F_n}{sin(\chi)} \tag{5.5}$$

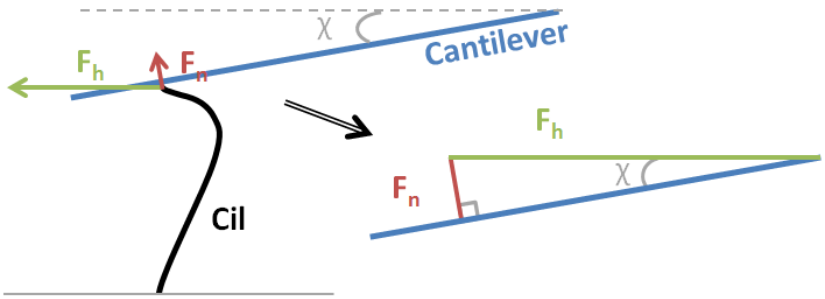


FIGURE 5.24 – **Schéma de la force exercée par les cils sur le cantilever**. Le cantilever est schématisé en bleu et un cil en noir. La force normale F_n est la composante normale de la force horizontale F_h développée par les cils. Le cantilever présente un angle de χ avec la surface.

D'après les données du fabriquant de l'AFM, on sait que l'angle χ est de 10°. On peut donc en déduire que la force horizontale F_h générée par les cils est égale à

$$F_h = 465,8 \pm 203,7 \text{ pN} \tag{5.6}$$

5.8.3 Estimation de la force générée par un cil

A une altitude de 7 µm, la surface du cantilever en contact avec la pointe des cils devrait être très réduite. En première approximation, et faute de mieux, nous avons considéré que seule une rangé de cils disposées orthogonalement à la direction principale du cantilever entrait en contact avec le cantilever lorsque l'extrémité du cil atteignait son altitude maximale. Nous avons aussi considéré que le contact ne se fait que lors de la phase aller puisque la phase retour n'atteint jamais cette altitude maximum (Fig. 5.16). En d'autre termes on fait l'hypothèse que la surface du cantilever en contact avec les cils se réduit à la largeur du cantilever (46 µm) multiplié par le diamètre d'un cil (0,2 µm), soit une surface de 46 × 0,2 = 9,2 µm^2. Selon [Hill et al., 2010], on trouve 5 cils par µm^2, nous aurions donc ici 46 cils en contact avec le cantilever. A partir de la force horizontale décrite précédemment (Eq.(5.6)), la force générée par un cil est de 10,1 ± 4,4 pN. Cette valeur est légérement plus petite que la valeur décrite par [Hill et al., 2010] pour des cils d'épithélium bronchique en culture, mais il s'agit d'une étude préliminaire qui nécessiterait d'être confirmé par un plus grand nombre d'expériences et qui mériterait aussi d'avoir une estimation plus fine de la surface de contact entre cils et cantilever.

Deuxième partie

Étude numérique

6 | Modèle numérique

Le déplacement de microbilles placées dans un fluide mis en mouvement par le battement des cils d'une bordure est simulé à l'aide d'un modèle bidimensionnel initialement proposé par [Ross and Corrsin, 1974] et récemment réutilisé par [Velez-Cordero and Lauga, 2013]. Ce modèle, du type "*volume-force*", utilise une approche enveloppe. L'ensemble des cils est assimilé à une surface ondulante qui recouvre la couche de cils (voir Fig. 6.1). Le détail de ce qui se passe sous cette enveloppe, c.a.d, là où sont les cils, est ignoré pour la résolution du problème. Si l'on suppose une distribution continue des cils le long de l'axe x, l'enveloppe mouvante définie par la position des pointes des cils pourra être vue comme une frontière continue générant une contrainte sur la couche de fluide au dessus des cils générant le mouvement du fluide. L'enveloppe sera utilisée comme condition limite du système pour résoudre les équations de Navier-Stokes. Ce modèle a été modifié pour intégrer les conditions expérimentales décrites en §4. En particulier, nous avons intégré un paramètre de "perte" permettant de prendre en compte une transmission non parfaite de la quantité de mouvement entre cils et fluide.

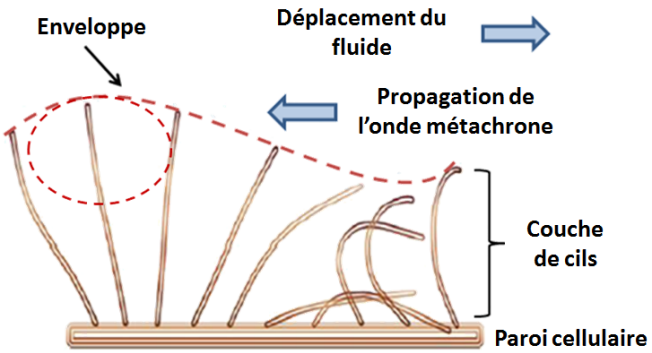


FIGURE 6.1 – **Représentation de l'enveloppe recouvrant la couche de cils et de la propagation de l'onde métachrone**. Adapté à partir du schéma original de [Velez-Cordero and Lauga, 2013].

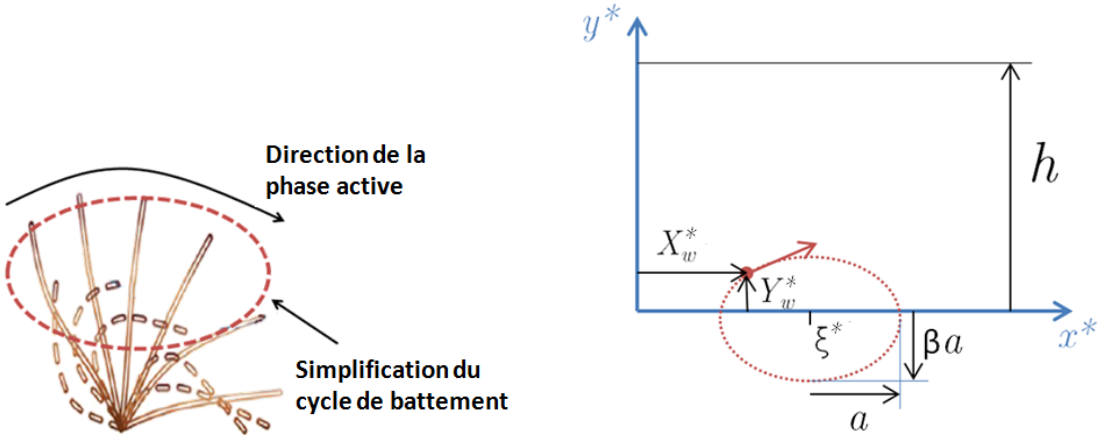
Dans notre cas, l'onde métachrone est explicitement imposée lors de la définition du mouvement de cette enveloppe. Cette enveloppe est ensuite utilisée comme condition limite pour calculer le champ de vitesses dans un écoulement de fluide dominé par les forces visqueuses. Les trajectoires des microbilles dans le champ de vitesses sont calculées en résolvant les équations de déplacement qui prennent en compte la force de trainée de Stokes. Finalement nous obtenons une prédiction de la vitesse effective des microbilles en fonction de leur altitude au dessus de la bordure ciliée.

6.1 Du battement d'un cil individuel à l'onde métachrone

La bordure ciliée est définie parallèle à l'axe x^*, la pointe du cil étant localisée en moyenne autour de $y^* = 0$. Chaque extrémité de cil décrit un mouvement elliptique périodique (voir Fig. 6.2(a)) en étant immergée dans un fluide. La pointe d'un cil localisée à la coordonnée horizontale ξ^* suit une trajectoire elliptique périodique centrée en $(\xi^*, 0)$ pendant chaque battement élémentaire (voir Fig. 6.2(b)) [Ross and Corrsin, 1974, Velez-Cordero and Lauga, 2013]. Au temps t^*, les coordonnées de la pointe (X_w^*, Y_w^*) sont

$$\begin{cases} X_w^* & = \xi^* - a\cos(\omega t^*) \\ Y_w^* & = \beta a \sin(\omega t^*) \end{cases} \tag{6.1}$$

où β est l'excentricité de l'ellipse, $2a$ est le grand axe dans la direction x^*, et $2\beta a$ le petit axe dans la direction y^*. Pour $\beta > 0$, La pointe tourne dans le sens horaire, alors que pour $\beta < 0$, la pointe tourne dans le sens anti-horaire. Enfin ω est la pulsation $(= 2\pi f)$ avec f la fréquence de battement ciliaire.



(a) Simplification du battement ciliaire en une ellipse (adapté à partir du schéma original de [Velez-Cordero and Lauga, 2013]).

(b) Mouvement elliptique schématique de la pointe d'un cil individuel. X_w^* et Y_w^* sont les coordonnées Lagrangienne de la pointe du cil, ξ^* est le centre de l'ellipse, $2a$ est le grand axe et $2\beta a$ est le petit axe. h est l'épaisseur de la couche de fluide recouvrant les cils.

FIGURE 6.2 – **Représentation schématique du mouvement elliptique de la pointe d'un cil**.

La propagation dans la direction inverse à l'axe x^* de l'onde métachrone de longueur d'onde λ est reproduite en introduisant un décalage de phase $\dfrac{2\pi\xi^*}{\lambda}$ dans le mouvement périodique de chaque cil qui dépend linéairement de la position du cil :

$$\begin{cases} X_w^* & = \xi^* - a\cos\left(\omega t^* + \dfrac{2\pi\xi^*}{\lambda}\right) \\ Y_w^* & = \beta a \sin\left(\omega t^* + \dfrac{2\pi\xi^*}{\lambda}\right) \end{cases} \tag{6.2}$$

La vitesse de propagation de l'onde correspondante est $c = f\lambda$.
L'utilisation de h et ω^{-1} comme unité de longueur et de temps fait alors apparaitre les paramètres sans dimensions suivants :

$$\varepsilon = \frac{a}{h}\ ,\ k = \frac{2\pi h}{\lambda}\ ,\ X_w = \frac{X_w^*}{h}\ ,\ Y_w = \frac{Y_w^*}{h}\ ,\ x = \frac{x^*}{h}\ ,\ y = \frac{y^*}{h}\ ,\ \xi = \frac{\xi^*}{h}\ ,\ t = \omega t^* \tag{6.3}$$

Les équations du mouvement de la pointe des cils sont réécrites sous forme adimensionnelle :

$$\begin{cases} X_w &= \xi - \varepsilon\cos(k\xi + t) \\ Y_w &= \beta\varepsilon\sin(k\xi + t) \end{cases} \tag{6.4}$$

A partir de l'équation (6.4), nous exprimons désormais la position d'une particule de l'enveloppe (ou de la paroi) dans le référentiel Eulérien (x, y, t). Pour chaque position x dans le référentiel Eulérien, la position verticale y de l'enveloppe est dépendante du temps. Une pointe localisée à la position x à un temps t correspond à un cil centré en ξ tel que :

$$x = \xi - \varepsilon\cos(k\xi + t) \tag{6.5}$$

Cette équation montre également que $(x - \xi)$ est de l'ordre de ε. Pour la suite, nous supposons que le demi grand axe de l'ellipse a (demi amplitude de battement ciliaire) est bien plus petit que l'épaisseur de la couche de fluide h, c.a.d. $\varepsilon \ll 1$. Donc $Y_w(\xi, t)$, coordonnée verticale de la pointe du cils, peut être développée autour de $\xi = x$ en utilisant une série de Taylor :

$$y_w(x,t) = Y_w(\xi,t) = Y_w(x,t) + (\xi - x)\left.\frac{\partial Y_w}{\partial \xi}\right|_{\xi=x} + \frac{(\xi - x)^2}{2}\left.\frac{\partial^2 Y_w}{\partial \xi^2}\right|_{\xi=x} + \dots \tag{6.6}$$

Puisqu'à la fois Y_w et $(\xi - x)$ sont au premier ordre de ε (Eqs. (6.4) et (6.5)), le développement au second ordre de y_w en ε est :

$$y_w(x,t) = \varepsilon\beta\sin(kx + t) + \varepsilon^2\beta k\cos^2(kx + t) + \mathcal{O}(\varepsilon^3) \tag{6.7}$$

Maintenant que nous avons déterminé la position de la paroi ciliée au temps t, on peut avoir sa vitesse. La composante horizontale de la vitesse de la paroi est obtenue comme la dérivée temporelle de la vitesse Lagrangienne de la pointe à la position x au temps t, tandis que sa composante verticale est calculée avec la dérivée temporelle de la coordonnée verticale de la paroi à la position x et au temps t :

$$\begin{cases} u_w(x,t) &= \left(\dfrac{\partial X_w}{\partial t}\right)_\xi = \varepsilon\sin(k\xi + t) \\ v_w(x,t) &= \dfrac{\partial y_w}{\partial t} = \varepsilon\beta\cos(kx + t) - \varepsilon^2\beta k\sin(2(kx + t)) \end{cases} \tag{6.8}$$

La valeur de ξ dans la vitesse horizontale est donnée par Eq.(6.5). Le développement de la composante horizontale de la vitesse de la paroi en série de Taylor en ξ donne :

$$\begin{aligned} u_w(x,t) &= \frac{\partial X_w}{\partial t}\Big|_{\xi=x} + (\xi - x)\frac{\partial^2 X_w}{\partial \xi^2}\Big|_{\xi=x} + \ \dots \\ &= \varepsilon \sin(kx+t) + [\varepsilon\cos(kx+t)][\varepsilon k \cos(kx+t)] \\ &= \varepsilon \sin(kx+t) + \varepsilon^2 k \cos^2(kx+t) + \mathcal{O}(\varepsilon^3) \end{aligned} \tag{6.9}$$

En se limitant dans les développements de Taylor aux premier et deuxième ordres, la coordonnée verticale de l'enveloppe et les composantes horizontale et verticale du vecteur vitesse (u_w, v_w) du mur cilié, à la position x dans le repère Eulérien sont données par :

$$y_w(x,t) = \varepsilon\beta \sin\theta + \frac{\varepsilon^2 \beta k}{2}\left(1+\cos(2\theta)\right) \tag{6.10}$$

$$u_w(x,t) = \varepsilon \sin\theta + \frac{\varepsilon^2 k}{2}\left(1+\cos(2\theta)\right) \tag{6.11}$$

$$v_w(x,t) = \varepsilon\beta\cos\theta - \varepsilon^2\beta k \sin(2\theta) \tag{6.12}$$

$\vec{U}_{w,1} = (u_{w,1}, v_{w,1})$ et $\vec{U}_{w,2} = (u_{w,2}, v_{w,2})$ désignent le premier et second ordre du développement en série de la vitesse du mur autour de ε tel que :

$$\vec{U}_w = \varepsilon\ \vec{U}_{w,1} + \frac{\varepsilon^2}{2}\ \vec{U}_{w,2} \tag{6.13}$$

$y_{w,1}$ et $y_{w,2}$ désignent le premier et second ordres de la coordonnée verticale du mur. $(\theta = kx + t)$ est la variable réduite permettant de prendre en compte la périodicité de l'onde métachrone λ. En résumé, nous avons :

$$\begin{cases} y_{w,1}(\theta) &= \beta\sin\theta = \dfrac{\beta}{2i}e^{i\theta} - \dfrac{\beta}{2i}e^{-i\theta} \\ y_{w,2}(\theta) &= \beta k\left(1+\cos(2\theta)\right) = \beta k + \dfrac{\beta k}{2}e^{2i\theta} + \dfrac{\beta k}{2}e^{-2i\theta} \\ u_{w,1}(\theta) &= \sin\theta = \dfrac{1}{2i}e^{i\theta} - \dfrac{1}{2i}e^{-i\theta} \\ u_{w,2}(\theta) &= k\left(1+\cos(2\theta)\right) = k + \dfrac{k}{2}e^{2i\theta} + \dfrac{k}{2}e^{-2i\theta} \\ v_{w,1}(\theta) &= \beta\cos\theta = \dfrac{\beta}{2}e^{i\theta} + \dfrac{\beta}{2}e^{-i\theta} \\ v_{w,2}(\theta) &= -2\beta k\sin(2\theta) = i\beta k\ e^{2i\theta} - i\beta k\ e^{-2i\theta} \end{cases} \tag{6.14}$$

6.2 Calcul du champ de vitesses

Nous allons maintenant calculer le champ de vitesses du fluide de masse volumique ρ et de viscosité dynamique μ dans un canal horizontal inclus entre $y = y_w(x,t)$ et $y = h$ dans la direction verticale (Fig. 6.3). Étant donné l'adimensionnement choisi en Eq.(6.3), les facteurs de normalisation de la vitesse U et de la pression P sont $h\omega$ et $\mu\omega$ respectivement. Par conséquent, les équations de Navier-Stokes s'écrivent sous forme adimensionnelle :

$$\alpha^2 \left(\frac{\partial \vec{U}}{\partial t} + (\vec{U} \cdot \vec{\nabla})\, \vec{U} \right) = -\vec{\nabla} p + \Delta \vec{U} \ , \tag{6.15}$$

où $\vec{U} = (u, v)$ est le champ de vitesses adimensionnelles, p est la pression adimensionnelle, et α est le nombre de Womersley défini par $\alpha^2 = \dfrac{\rho h^2 \omega}{\mu}$.

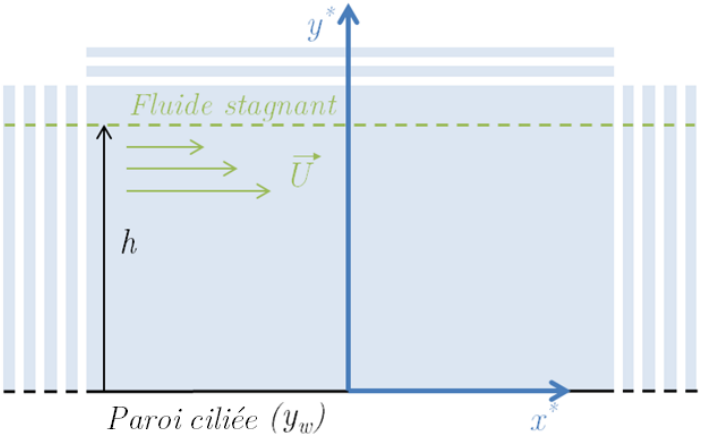


FIGURE 6.3 – **Schéma du canal dans lequel est calculé le champ de vitesses**. y_w correspond à l'enveloppe des cils. h est l'épaisseur de la couche de fluide recouvrant les cils. $\vec{U}$ indique le champ de vitesses. La zone bleu représente le fluide.

Quand α tend vers 0, nous retrouvons les équations de Stokes d'un écoulement stationnaire. Dans notre cas, les valeurs typiques de la hauteur du canal et de la fréquence de battement sont $h = 50$ µm and $f = 10$ Hz. Dans le milieu de survie cellulaire dont les propriétés thermodynamiques sont quasiment celles de l'eau ($\rho = 1000$ kg.m^{-3} et $\mu = 10^{-3}$ Pa.s), la valeur typique du nombre de Womersley est d'environ $\alpha \approx 0,4$.

Conditions limites

L'enveloppe est la condition limite du problème, elle doit être périodique dans la direction horizontale avec une période égale à la longueur d'onde de l'onde métachrone (correspondant ici sous forme adimensionnelle à $\lambda/h = 2\pi/k$).

$$\vec{U}\left(\frac{2\pi}{k}, y, t\right) = \vec{U}(0, y, t) \tag{6.16}$$

A l'extrémité supérieure du domaine ($y = 1$), la vitesse du fluide et la contrainte de cisaillement s'annulent :

$$v(x, 1, t) = 0 \qquad \text{et} \qquad \left.\frac{\partial u}{\partial y}\right|_{(x,1,t)} = 0 \tag{6.17}$$

De plus sur l'enveloppe ($y = y_w$), nous introduisons un paramètre de "perte" ϕ permettant de prendre en compte des phénomènes de transmission non parfaite de la quantité de mouvement entre les cils et le fluide :

$$\left.\left(\vec{U} - \phi\frac{\partial \vec{U}}{\partial y}\right)\right|_{(x,y_w,t)} = \vec{U}_w(x, t) \tag{6.18}$$

où ϕ peut être vu comme une longueur de glissement effective réduisant le transfert de quantité de mouvement entre l'enveloppe et le fluide [Zhang et al., 2015]. Si $\phi = 0$, on retrouve des conditions limites de non glissement alors que $\phi \to +\infty$ correspond à une condition de glissement parfait où il n'y aucune transmission de quantité de mouvement entre le mur cilié et le fluide. Cette formulation est aussi analogue à un écoulement le long d'une paroi poreuse, où la présence de pores réduit le transfert de la quantité de mouvement entre la paroi et le fluide [Beavers and Joseph, 1967, Verma and Tripathee, 2013]. Dans l'expression (6.18), cette longueur de glissement ϕ apparaît sous forme adimensionnelle. Sa valeur dimensionnée est : $\Phi = h \times \phi$.

Nous pouvons développer le champ de vitesses $\vec{U}$ au second ordre de ε, tel que :

$$\vec{U} = \varepsilon\ \vec{U}_1 + \frac{\varepsilon^2}{2}\ \vec{U}_2 \tag{6.19}$$

Nous pouvons alors exprimer les conditions limites à tous les ordres de ε. Pour $y_{w,1}$, premier ordre en ε, la condition limite peut être développée autour de $y = 0$ à la fois pour la vitesse $\vec{U}$ et pour sa dérivée normale $\partial\vec{U}/\partial y$:

$$\begin{aligned}
\vec{U}(y_w) &= \vec{U}(0) + y_w \left.\frac{\partial \vec{U}}{\partial y}\right|_{y=0} + \mathcal{O}(\varepsilon^3) \\
&= \varepsilon\vec{U}_1(0) + \frac{\varepsilon^2}{2}\vec{U}_2(0) + \left[\varepsilon y_{w,1} + \frac{\varepsilon^2}{2}y_{w,2}\right]\left[\varepsilon\left.\frac{\partial \vec{U}_1}{\partial y}\right|_0 + \frac{\varepsilon^2}{2}\left.\frac{\partial \vec{U}_2}{\partial y}\right|_0\right] + \mathcal{O}(\varepsilon^3) \qquad (6.20)\\
\left.\frac{\partial \vec{U}}{\partial y}\right|_{y_w} &= \left.\frac{\partial \vec{U}}{\partial y}\right|_0 + y_w\left.\frac{\partial^2 \vec{U}}{\partial y^2}\right|_0 + \mathcal{O}(\varepsilon^3) \\
&= \varepsilon\left.\frac{\partial \vec{U}_1}{\partial y}\right|_0 + \frac{\varepsilon^2}{2}\left.\frac{\partial \vec{U}_2}{\partial y}\right|_0 + \left[\varepsilon y_{w,1} + \frac{\varepsilon^2}{2}y_{w,2}\right]\left[\varepsilon\left.\frac{\partial^2 \vec{U}_1}{\partial y^2}\right|_0 + \frac{\varepsilon^2}{2}\left.\frac{\partial^2 \vec{U}_2}{\partial y^2}\right|_0\right] + \mathcal{O}(\varepsilon^3) \qquad (6.21)
\end{aligned}$$

L'insertion de Eq.(6.20) et Eq.(6.21) dans la seconde équation du système (6.18) donne le second ordre du développement (en ε) de la condition limite au mur cilié :

$$\vec{U}_1(0) - \phi \frac{\partial \vec{U}_1}{\partial y}\bigg|_0 = \vec{U}_{w,1} \tag{6.22}$$

$$\vec{U}_2(0) - \phi \frac{\partial \vec{U}_2}{\partial y}\bigg|_0 = \vec{U}_{w,2} - 2y_{w,1}\left(\frac{\partial \vec{U}_1}{\partial y}\bigg|_0 - \phi \frac{\partial^2 \vec{U}_1}{\partial y^2}\bigg|_0\right) \tag{6.23}$$

6.3 Reformulation du problème en utilisant la fonction de courant

Puisque dans notre problème l'écoulement est bidimensionnel, le champ de vitesses peut être calculé en introduisant la fonction de courant ψ tel que :

$$u = \frac{\partial \psi}{\partial y} \qquad \text{et} \qquad v = -\frac{\partial \psi}{\partial x} \tag{6.24}$$

Cette solution satisfait automatiquement l'équation de continuité ($\mathrm{div}(\vec{U}) = 0$). L'équation de Navier-Stokes adimensionnelle s'écrit maintenant :

$$\begin{cases} \alpha^2 \left(\psi_{yt} + \psi_y \psi_{yx} - \psi_x \psi_{yy}\right) & = -p_x + \psi_{yxx} + \psi_{yyy} \\ \alpha^2 \left(-\psi_{xt} + \psi_y \psi_{xx} + \psi_x \psi_{xy}\right) & = -p_y - \psi_{xxx} - \psi_{xyy} \end{cases} \tag{6.25}$$

Une équation différentielle partielle en ψ est obtenue en prenant la dérivée en y de la première équation et en lui soustrayant la dérivée en x de la seconde équation afin de faire disparaitre les termes de pression :

$$\begin{aligned} \alpha^2 \left\{\psi_{xxt} + \psi_{yyt} + \psi_y \psi_{yyx} - \psi_x \psi_{yyy} + \psi_y \psi_{xxx} - \psi_x \psi_{xxy}\right\} = \\ \psi_{yyyy} + 2\psi_{xx}\psi_{yy} + \psi_{xxxx} \end{aligned} \tag{6.26}$$

qui peut être réécrit sous la forme compacte suivante :

$$\alpha^2 \left\{\Delta\psi_t + \psi_y \Delta\psi_x - \psi_x \Delta\psi_y\right\} = \Delta^2 \psi \tag{6.27}$$

6.3.1 Développement asymptotique en ε de la fonction de courant

Nous pouvons maintenant développer la fonction de courant au second ordre de ε :

$$\psi = \varepsilon \psi_1 + \frac{\varepsilon^2}{2}\psi_2 \tag{6.28}$$

Le terme d'ordre zéro ψ_0 n'existe pas car on suppose que le mouvement du fluide est uniquement généré par le battement ciliaire, et qu'il s'annule lorsque $\varepsilon = 0$. Les 2 ordres (en ε) sont calculés en série. Le premier ordre de Eq.(6.27) est :

$$\alpha^2 \Delta\psi_{1,t} = \Delta^2\psi_1 \tag{6.29}$$

Tandis que le second ordre est :

$$\alpha^2 \left\{\Delta\psi_{2,t} + 2\psi_{1,y}\Delta\psi_{1,x} - 2\psi_{1,x}\Delta\psi_{1,y}\right\} = \Delta^2\psi_2 \tag{6.30}$$

La condition limite au mur inférieur (enveloppe de cils) relie les premier et second ordres ψ_1 and ψ_2 par une condition de type Robin (Eq.(6.18)). Les deux composantes de la vitesse et les deux ordres (en ε) donnent 4 équations de la condition limite au mur cilié :

$$\psi_{1,y}\Big|_{(x,0)} - \phi\ \psi_{1,yy} = \sin\theta \tag{6.31}$$

$$\psi_{1,x}\Big|_{(x,0)} - \phi\ \psi_{1,xy} = -\beta\cos\theta \tag{6.32}$$

$$\psi_{2,y}\Big|_{(x,0)} - \phi\ \psi_{2,yy} = k\left(1+\cos(2\theta)\right) - 2\beta\sin\theta\ \left(\psi_{1,yy} - \phi\ \psi_{1,yyy}\right) \tag{6.33}$$

$$\psi_{2,x}\Big|_{(x,0)} - \phi\ \psi_{2,xy} = 2\beta k\sin(2\theta) - 2\beta\sin\theta\ \left(\psi_{1,xy} - \phi\ \psi_{1,xyy}\right) \tag{6.34}$$

La fonction de courant peut alors être calculée en première approximation comme si le domaine était un canal droit compris entre $y = 0$ et $y = 1$.

6.3.2 Premier ordre de la fonction de courant

$\psi_1(x, y, t)$ est une fonction périodique le long de x de période $2\pi/k$ qui doit être solution du système suivant :

$$\begin{cases} \Delta^2\psi_1 - \alpha^2\Delta\psi_{1,t} = 0 & \\ \psi_{1,y} - \phi\ \psi_{1,yy} = \sin\theta & \text{pour } y = 0 \\ \psi_{1,x} - \phi\ \psi_{1,xy} = -\beta\cos\theta & \text{pour } y = 0 \\ \psi_{1,yy} = 0 & \text{pour } y = 1 \\ \psi_{1,x} = 0 & \text{pour } y = 1 \end{cases} \tag{6.35}$$

Nous développons ψ_1 en séries de Fourier le long de la direction x, ce qui correspond à la propagation d'une onde se déplaçant dans la direction inverse de x (avec une vitesse de propagation "normalisée" $= -1$)

$$\psi_1(x, y, t) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} a_n(y)\ e^{in(kx+t)} \tag{6.36}$$

Chaque terme de cette série de Fourier satisfait la première équation du système (6.35), ce qui implique que :

$$\left(a_n'''' - 2k^2n^2a_n'' + k^4n^4a_n\right) - in\alpha^2\left(a_n'' - k^2n^2a_n\right) = 0 \ . \tag{6.37}$$

L'équation caractéristique de l'équation différentielle s'écrit :

$$\delta^4 - 2k^2n^2\delta^2 + k^4n^4 - in\alpha^2\left(\delta^2 - k^2n^2\right) = 0 \tag{6.38}$$

Ou, encore

$$\delta^4 - \left(2k^2n^2 + in\alpha^2\right)\delta^2 + k^2n^2\left(k^2n^2 + in\alpha^2\right) = 0 \tag{6.39}$$

Les 4 solutions de l'équation sont :

$$\delta = \pm\ kn \qquad \text{et} \qquad \delta = \pm\ \gamma_n \quad \text{with } \gamma_n = \sqrt{k^2n^2 + in\alpha^2} \tag{6.40}$$

Pour $n \neq 0$, les solutions peuvent être exprimées comme une combinaison linéaire de e^{kny}, e^{-kny}, $e^{\gamma_n y}$, et $e^{-\gamma_n y}$. La solution générale de Eq.(6.37) s'écrit alors :

$$a_n(y) = \begin{cases} A_0 + B_0\ y + C_0\ y^2 + D_0\ y^3 & \text{si } n = 0\ , \\ C_n e^{kny} + A_n e^{-kny} + \ D_n e^{\gamma_n y} + B_n e^{-\gamma_n y} & \text{si } n \neq 0\ . \end{cases} \tag{6.41}$$

Les coefficients de Fourier sont déterminés en utilisant les conditions limites du système (6.35). Dans nos expériences (§8.1), la valeur de k est bien plus grande que 1 (≈ 10). Pour satisfaire les conditions limites en $y = 1$ (deux dernières équations de Eq (6.35)), les termes en $e^{\gamma_n y}$, et $e^{-\gamma_n y}$ doivent être nuls ($C_n = D_n = 0$). Finalement, les seuls termes non homogènes dans ces conditions limites sont $e^{i\theta}$ et $e^{-i\theta}$ ($\sin\theta$ et $\cos\theta$). Cela implique que les seuls coefficients qui ne s'annulent pas sont obtenus pour $n = 1$ et $n = -1$, ce qui nous donne l'expression suivante de ψ_1 :

$$\psi_1(x, y, t) = \sum_{|n|=1} \left[A_n e^{-kny} + B_n e^{-\gamma_n y}\right]\ e^{in\theta} \tag{6.42}$$

On peut remarquer que $\gamma_{-n} = \bar{\gamma}_n$, ce qui implique que tous les coefficients de Fourier doivent satisfaire la propriété de symétrie $A_{-1} = \bar{A}_1$ et $B_{-1} = \bar{B}_1$ afin d'obtenir une solution réelle pour ψ_1. La fonction de courant ψ_1 est donc :

$$\psi_1(x, y, t) = \left[A_1 e^{-ky} + B_1 e^{-\gamma_1 y}\right]\ e^{i\theta} + c.c. \tag{6.43}$$

où $c.c$ désigne les complexes conjugués. Le champ de vitesses au premier ordre (en ε) est :

$$\begin{cases} u_1 = \psi_{1,y} = -2\ \mathrm{Re}\left\{\left[kA_1 e^{-ky} + \gamma_1 B_1 e^{-\gamma_1 y}\right]\ e^{i\theta}\right\} \\ v_1 = -\psi_{1,x} = -2k\ \mathrm{Im}\left\{\left[A_1 e^{-ky} + B_1 e^{-\gamma_1 y}\right]\ e^{i\theta}\right\} \end{cases} \tag{6.44}$$

Les conditions limites à $y = 0$ (Eq.(6.35)) peuvent donc être exprimées comme suit :

$$\begin{cases} -kA_1 - \gamma_1 B_1 - \phi\left(k^2 A_1 + \gamma_1^2 B_1\right) + c.c & = \dfrac{1}{2i} \\ ik\Big[A_1 + B_1 - \phi\left(-kA_1 - \gamma_1 B_1\right)\Big] + c.c & = -\dfrac{\beta}{2} \end{cases} \tag{6.45}$$

$$\begin{cases} A_1(-k - k^2\phi) + B_1(-\gamma_1 - \gamma_1^2\phi) + c.c. = \dfrac{1}{2i} \\ A_1(ik + ik^2\phi) + B_1(ik + ik\gamma_1\phi) + c.c. = -\dfrac{\beta}{2} \end{cases} \tag{6.46}$$

On obtient ainsi un système linéaire 2×2 en (A_1, B_1) qui peut être résolu en utilisant le déterminant de Cramer. A_1 et B_1 sont donc :

$$A_1 = \frac{i}{2(1+k\phi)}\left(\frac{\frac{\beta\gamma_1}{k} - 1}{\gamma_1 - k}\right) \qquad \text{et} \qquad B_1 = \frac{i}{2(1+\gamma_1\phi)}\left(\frac{1-\beta}{\gamma_1 - k}\right) \tag{6.47}$$

6.3.3 Second ordre de la fonction de courant

$\psi_2(x, y, t)$ est une fonction périodique de période $2\pi/k$ le long de x qui résout le système suivant :

$$\begin{cases} \Delta^2\psi_2 - \alpha^2\Delta\psi_{2,t} = 2\alpha^2\left\{\psi_{1,y}\Delta\psi_{1,x} - \psi_{1,x}\Delta\psi_{1,y}\right\} & \\ \psi_{2,y} - \phi\ \psi_{2,yy} = k\left(1 + \cos(2\theta)\right) - 2\beta\sin\theta\ \psi_{1,yy} + 2\beta\phi\sin\theta\ \psi_{1,yyy} & \text{pour } y = 0 \\ \psi_{2,x} - \phi\ \psi_{2,xy} = 2\beta k\sin(2\theta) - 2\beta\sin\theta\ \psi_{1,xy} + 2\beta\phi\sin\theta\ \psi_{1,xyy} & \text{pour } y = 0 \end{cases} \tag{6.48}$$

Puisque le premier ordre ψ_1 de la fonction de courant contient uniquement des termes en $e^{i\theta}$ et $e^{-i\theta}$ (voir §6.3.2), une rapide analyse des conditions limites ci dessus montre que le second ordre ψ_2 va seulement contenir des termes constants ou proportionnels à $e^{2i\theta}$ et $e^{-2i\theta}$. Nous sommes ici uniquement intéressés par le terme constant, qui correspond à la composante non nulle du champ de vitesses constant dans le développement en ε. A partir de Eq.(6.30), nous savons que la composante constante de ψ_2, appelée $\psi_2^{(s)}$, résout l'équation suivante :

$$\Delta^2\psi_2^{(s)} = 2\alpha^2\left\{\psi_{1,y}\Delta\psi_{1,x} - \psi_{1,x}\Delta\psi_{1,y}\right\}^{(s)} \tag{6.49}$$

où l'exposant '(s)'signifie "*steady*" pour constant en anglais. Plus précisément, le terme entre crochets peut être réécrit :

$$\begin{aligned} \psi_{1,y}\Delta\psi_{1,x} - \psi_{1,x}\Delta\psi_{1,y} &= \psi_{1,y}\left(\psi_{1,xxx} + \psi_{1,xyy}\right) - \psi_{1,x}\left(\psi_{1,xxy} + \psi_{1,yyy}\right) \\ &= \left(\psi_{1,y}\psi_{1,xyy} - \psi_{1,x}\psi_{1,yyy}\right) + \left(\psi_{1,y}\psi_{1,xxx} - \psi_{1,x}\psi_{1,xxy}\right) \\ &= \left(\psi_{1,y}\psi_{1,xy} - \psi_{1,x}\psi_{1,yy}\right)_y + \left(\psi_{1,y}\psi_{1,xx} - \psi_{1,x}\psi_{1,xy}\right)_x \end{aligned} \tag{6.50}$$

Si l'on examine la dépendance en x des produits apparus à la dernière ligne, on peut voir que tous ces produits contiennent des termes soit constants, soit dépendants exponentiellement de x. De plus, la contribution de la seconde parenthèse au terme constant de la fonction de courant peut uniquement être constant. Sa dérivée en x s'annule donc et ce terme peut être supprimé de l'équation de $\psi_2^{(s)}$, ce qui nous laisse uniquement la première parenthèse :

$$\psi^s_{2,yyyy} = 2\alpha^2\Big(\psi_{1,y}\psi_{1,yx} - \psi_{1,x}\psi_{1,yy}\Big)^s_y \tag{6.51}$$

en intégrant selon y, nous avons :

$$\psi^{(s)}_{2,yyy} = 2\alpha^2\Big(\psi_{1,y}\psi_{1,yx} - \psi_{1,x}\psi_{1,yy}\Big)^{(s)} + 2A_2 \tag{6.52}$$

où $2A_2$ est le terme constant de l'intégration. On peut noter que $\varepsilon^2 A_2$ peut être interprété comme la composante constante du gradient de pression ($p^{(s)}_{2,x}$) qui apparait dans le terme de droite de l'équation de Navier-Stokes (Eq.(6.15)). A partir de la partie précédente (Eq.(6.43)), nous savons que ψ_1 peut être écrit :

$$\psi_1(x,y,t) = a_1(y)\ e^{i\theta} + c.c. \qquad \text{avec} \qquad a_1(y) = A_1 e^{-ky} + B_1 e^{-\gamma_1 y} \tag{6.53}$$

Par conséquent,

$$\begin{cases} \psi_{1,x} = ika_1(y)\ e^{i\theta} + c.c. \\ \psi_{1,y} = a_{1,y}(y)\ e^{i\theta} + c.c. \\ \psi_{1,yx} = ika_{1,y}(y)\ e^{i\theta} + c.c. \\ \psi_{1,yy} = a_{1,yy}(y)\ e^{i\theta} + c.c. \end{cases} \tag{6.54}$$

En insérant ces expressions dans le terme de droite entre parenthèses de Eq (6.52), on obtient :

$$\Big(\psi_{1,y}\psi_{1,yx} - \psi_{1,x}\psi_{1,yy}\Big)^{(s)} = -ik|a_1'|^2 - ika_1\bar{a}_1'' + c.c. = 2k\ \mathrm{Im}(a_1\bar{a}_1'') \tag{6.55}$$

Le premier terme, du coté droit de l'équation ci dessus, étant imaginaire, sa contribution s'annule lorsque l'on ajoute son complexe conjugué. Eq.(6.52) et la première condition limite du système Eq.(6.48) nous donne le système simple suivant pour $\psi_2^{(s)}$ en θ (et donc en x) :

$$\begin{cases} \psi^{(s)}_{2,yyy} = 4\alpha^2 k\ \mathrm{Im}(a_1\bar{a}_1'') + 2A_2 \\ \psi^{(s)}_{2,y}(x,0) - \phi\ \psi^{(s)}_{2,yy}(x,0) = k + C \end{cases} \tag{6.56}$$

avec :

$$\begin{aligned} a_1(y) &= A_1 e^{-ky} + B_1 e^{-\gamma_1 y} \\ \bar{a}_1''(y) &= k^2\bar{A}_1 e^{-ky} + \bar{\gamma}_1^2\bar{B}_1 e^{-\bar{\gamma}_1 y} \end{aligned} \tag{6.57}$$

et où C représente la contribution constante de $-2\beta \sin\theta \ \left(\psi_{1,yy} - \phi \ \psi_{1,yyy}\right)\Big|_{y=0}$.
L'équation (6.53) implique que :

$$\psi_{1,yy} - \phi \ \psi_{1,yyy} = \left(a_{1,yy} - \phi \ a_{1,yyy}\right) \ e^{i\theta} + c.c. \tag{6.58}$$

Dès lors, la contribution constante C peut être exprimée à partir des coefficients A_1 et B_1 calculés précédemment :

$$\begin{aligned} C &= 2\beta \ \mathrm{Im}\Big(a_1''(0) - \phi \ a_1'''(0)\Big) \\ &= 2\beta \ \mathrm{Im}\Big(k^2 A_1 + \gamma_1^2 B_1 + k^3 \phi A_1 + \gamma_1^3 \phi B_1\Big) \end{aligned} \tag{6.59}$$

Les valeurs de A_1 et B_1 (Eq ; (6.47)) donnent directement :

$$\begin{aligned} C &= 2\beta \ \mathrm{Im}\left[\frac{ik^2}{2}\left(\frac{\frac{\beta\gamma_1}{k} - 1}{\gamma_1 - k}\right) + \frac{i\gamma_1^2}{2}\left(\frac{1-\beta}{\gamma_1 - k}\right)\right] \\ &= \beta k + \beta(1-\beta) \ \mathrm{Re}(\gamma_1) \end{aligned} \tag{6.60}$$

Nous revenons maintenant à $\mathrm{Im}(a_1 \bar{a}_1'')$ afin de déterminer $\psi_2^{(s)}$. A partir de Eq.(6.43), ce terme peut être réécrit :

$$\begin{aligned} \mathrm{Im}(a_1 \bar{a}_1'') &= \mathrm{Im}\Big\{\Big(A_1 e^{-ky} + B_1 e^{-\gamma_1 y}\Big)\Big(k^2 \bar{A}_1 e^{-ky} + \bar{\gamma}_1^2 \bar{B}_1 e^{-\bar{\gamma}_1 y}\Big)\Big\} \\ &= \mathrm{Im}\Big\{\bar{\gamma}_1^2 A_1 \bar{B}_1 e^{-(k+\bar{\gamma}_1)y} + k^2 \bar{A}_1 B_1 e^{-(k+\gamma_1)y} + \bar{\gamma}_1^2 B_1 \bar{B}_1 e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)y}\Big\} \end{aligned} \tag{6.61}$$

L'utilisation de la relation $\bar{\gamma}_1^2 = k^2 - i\alpha^2$ nous permet de simplifier l'expression ci dessus en :

$$\begin{aligned} \mathrm{Im}(a_1 \bar{a}_1'') &= \mathrm{Im}\Big\{ - i\alpha^2 A_1 \bar{B}_1 e^{-(k+\bar{\gamma}_1)y} - i\alpha^2 |B_1|^2 e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)y}\Big\} \\ &= -\alpha^2 \left[\mathrm{Re}\left(A_1 \bar{B}_1 e^{-(k+\bar{\gamma}_1)y}\right) + |B_1|^2 e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)y}\right] \end{aligned} \tag{6.62}$$

En intégrant deux fois la première équation du système (6.56), on obtient :

$$\psi_{2,yy}^{(s)} = \frac{A_2}{2} \ y + B_2 - 4\alpha^4 k \left[\mathrm{Re}\left(A_1 \bar{B}_1 \ \frac{e^{-(k+\bar{\gamma}_1)y}}{(k+\bar{\gamma}_1)}\right) + |B_1|^2 \ \frac{e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)y}}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)}\right] \tag{6.63}$$

$$\psi_{2,y}^{(s)} = A_2 \ y^2 + B_2 \ y + C_2 - 4\alpha^4 k \left[\mathrm{Re}\left(A_1 \bar{B}_1 \ \frac{e^{-(k+\bar{\gamma}_1)y}}{(k+\bar{\gamma}_1)^2}\right) + |B_1|^2 \ \frac{e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)y}}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)^2}\right] \tag{6.64}$$

où B_2 et C_2 sont des constantes d'intégration. La composante constante de la vitesse horizontale du fluide apparait donc comme une somme entre un profil de vitesses parabolique et deux profils de vitesses exponentiels. Les constantes A_2, B_2, and C_2 sont déterminées avec les conditions limites :

$$\begin{cases} \psi_{2,y}^{(s)}(1) & = 0 = A_2 + B_2 + C_2 + G_1 \\ \psi_{2,yy}^{(s)}(1) & = 0 = 2A_2 + B_2 + G_2 \\ \psi_{2,y}^{(s)}(0) - \phi\ \psi_{2,yy}^{(s)}(0) & = k + C = C_2 - \phi B_2 + G_3 + k + C \end{cases} \tag{6.65}$$

où G_1, G_2 et G_3 sont définis par :

$$\begin{cases} G_1 & = 4\alpha^4 k\left(- \mathrm{Re}\left(A_1 \bar{B}_1\ \dfrac{e^{-(k+\bar{\gamma}_1)}}{(k+\bar{\gamma}_1)^2}\right) - |B_1|^2\ \dfrac{e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)}}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)^2}\right) \\ G_2 & = 4\alpha^4 k\left(\mathrm{Re}\left(A_1 \bar{B}_1\ \dfrac{e^{-(k+\bar{\gamma}_1)}}{(k+\bar{\gamma}_1)}\right) + |B_1|^2\ \dfrac{e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)}}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)}\right) \\ G_3 & = 4\alpha^4 k\left(- \mathrm{Re}\left(\dfrac{A_1 \bar{B}_1}{(k+\bar{\gamma}_1)^2}\right) - \phi\ \mathrm{Re}\left(\dfrac{A_1 \bar{B}_1}{(k+\bar{\gamma}_1)}\right) - \dfrac{|B_1|^2}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)^2} - \phi\dfrac{|B_1|^2}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)}\right) - k - C \end{cases} \tag{6.66}$$

On obtient pour les coefficients A_2, B_2 et C_2 le système (3×3) suivant :

$$\begin{cases} A_2 + B_2 + C_2 & = -G_1 \\ 2A_2 + B_2 & = -G_2 \\ -\phi B_2 + C2 & = -G3 \end{cases} \tag{6.67}$$

Les coefficients du profil parabolique de la vitesse constante sont finalement :

$$\begin{cases} A_2 & = \dfrac{G_1 - (1+\phi)G_2 - G_3}{1+2\phi} \\ B_2 & = \dfrac{-2G_1 + G_2 + 2G_3}{1+2\phi} \\ C_2 & = \dfrac{-2\phi\ G_1 + \phi\ G_2 - G_3}{1+2\phi} \end{cases} \tag{6.68}$$

Finalement, la composante continue du champ de vitesses au second ordre (en ε) est :

$$\begin{cases} u_2^{(s)} = \psi_{2,y}^{(s)} = & A_2\ y^2 + B_2\ y + C_2 - 4\alpha^4 k\left[\mathrm{Re}\left(A_1 \bar{B}_1\ \frac{e^{-(k+\bar{\gamma}_1)y}}{(k+\bar{\gamma}_1)^2}\right) + |B_1|^2\ \frac{e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)y}}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)^2}\right] \\ v_2^{(s)} = -\psi_{2,x}^{(s)} = 0 \end{cases} \tag{6.69}$$

6.4 Solution du champ de vitesses

Finalement, le champ de vitesses peut être reconstruit en utilisant le développement asymptotique (en ε)(Eq.(6.28)) :

$$\begin{cases} u &= \varepsilon u_1 + \dfrac{\varepsilon^2}{2} u_2^{(s)} \\ v &= \varepsilon v_1 + \dfrac{\varepsilon^2}{2} v_2^{(s)} \end{cases} \tag{6.70}$$

Ce qui permet de définir le champ de vitesses à partir du premier ordre Eq.(6.44) et du second ordre Eq.(6.69) par :

$$\begin{cases} u &= \varepsilon \left(-2 \text{ Re}\left\{ \left[k A_1 e^{-ky} + \gamma_1 B_1 e^{-\gamma_1 y} \right] e^{i\theta} \right\} \right) \\ & + \dfrac{\varepsilon^2}{2} \left(A_2\, y^2 + B_2\, y + C_2 - 4\alpha^4 k \left[\text{Re}\left(A_1 \bar{B}_1 \, \dfrac{e^{-(k+\bar{\gamma}_1)y}}{(k+\bar{\gamma}_1)^2} \right) + |B_1|^2 \, \dfrac{e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)y}}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)^2} \right] \right) \\ v &= \varepsilon \left(-2k \text{ Im}\left\{ \left[A_1 e^{-ky} + B_1 e^{-\gamma_1 y} \right] e^{i\theta} \right\} \right) + \dfrac{\varepsilon^2}{2} (0) \end{cases} \tag{6.71}$$

6.5 Simulation du déplacement des microbilles

Une fois que le champ de vitesses oscillant $\vec{U} = (u, v)$ est calculé, les trajectoires et les temps de parcours des microbilles dans ce champ peuvent être calculés en résolvant l'équation du mouvement :

$$m \, \frac{d\vec{U}_b^*}{dt} = \vec{F}_{\text{drag}} \ , \tag{6.72}$$

où m est la masse individuelle d'une microbille, $\vec{U}_b^*$ sa vitesse, et $\vec{F}_{\text{drag}}$ est la force de trainée exercée par le flux sur la microbille .

En supposant une forme sphérique de la microbille et de petites différences de vitesse entre la microbille et le fluide, la force de trainée se réduit à la loi de Stokes.

$$\vec{F}_{\text{drag}} = -6\pi R \mu \left(\vec{U}_b^* - \vec{U}^* \right) \tag{6.73}$$

où R représente le rayon de la microbille.

En utilisant comme précédemment h et w^{-1} comme unités de longueur et de temps, l'équation (6.72) peut être adimensionnée :

$$\frac{d\vec{U}_b}{dt} = \frac{\vec{U} - \vec{U}_b}{St_k} \qquad \text{avec} \qquad St_k = \frac{m\omega}{6\pi R \mu} \tag{6.74}$$

St_k est le nombre de Stokes de la microbille, déterminant l'inertie effective de la microbille dans le flux. Pour une particule sphérique de rayon R et de densité ρ_b, ce nombre s'écrit :

$$St_k = \frac{\frac{4}{3}\pi R^3 \rho_b \omega}{6\pi R\mu} = \frac{2}{9}\frac{R^2 \rho_b \omega}{\mu} \tag{6.75}$$

Les microbilles mesurent environ 4,5 µm de diamètre et sont en polystyrène (masse volumique ρ_b de l'ordre de 1 kg.l). A 10 Hz dans l'eau, le nombre de Stokes correspondant est d'environ 10^{-4}, ce qui signifie que les microbilles peuvent être considérées comme des traceurs sans masse. Leur vitesse peut être assimilée à la vitesse du fluide à la même position.

Pour chaque microbille entrant dans la fenêtre de simulation en $x = 0$ à une altitude donnée $y = \kappa$ et sortant de la fenêtre de simulation en $x = L$ à la vitesse effective U_{eff} est calculée comme suit :

$$U_{\text{eff}}(\kappa) = \frac{L}{\tau(\kappa)} = \frac{L}{\oint_{\mathcal{T}_\kappa} dt} = \frac{L}{\oint_{\mathcal{T}_\kappa} \frac{ds}{\|\vec{U}(c)\|}} \ , \tag{6.76}$$

où $\tau(\kappa)$ est le temps de parcours de la microbille entrée à $(0, \kappa)$, et $\mathcal{T}_\kappa$ est la trajectoire suivie par cette microbille. L définit ici la taille du champ de notre modélisation (qui correspond à la taille du champ observable en microscopie). Durant chaque pas élémentaire de cette trajectoire, la durée infinitésimale est $dt = ds/\|\vec{U}(c)\|$, $\vec{U}$ étant la vitesse du fluide à l'abscisse curviligne c de la trajectoire. La vitesse effective U_{eff} corresponds à la quantité mesurée dans nos expériences de suivi de microbilles (§4.4)

7 | Résultats et discussion du modèle numérique

Comme cela a été décrit en §6.4, le champ de vitesses global est la somme du champ de vitesses à l'ordre 1 et du champ de vitesses à l'ordre 2. Je présente dans un premier temps les différents ordres du champs de vitesses puis à partir du champ de vitesses global, les trajectoires et la vitesse des microbilles.

7.1 Premier ordre du champ de vitesses

Le système d'équations (6.44) montre que le premier ordre du champ de vitesses est purement oscillant dans le temps et périodique dans la direction horizontale. Nous avons donc représenté les composantes horizontale (Fig. 7.1) et verticale (Fig. 7.2) à 8 instants de la période temporelle et sur seulement 2,5 longueurs d'onde dans la direction de x. On peut noter que les vitesses du premier ordre du champ de vitesses horizontal sont plus importantes que celles du premier ordre vertical.

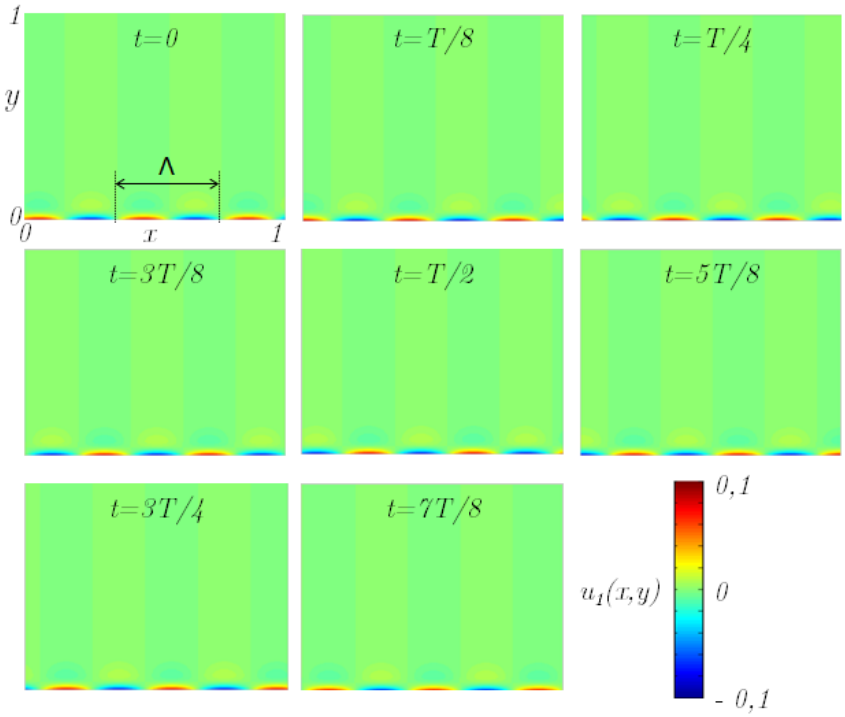


FIGURE 7.1 – **Premier ordre champ de vitesses horizontale du fluide**. Les positions x et y, le premier ordre de la vitesse horizontale du fluide u_1 et le temps t sont sans dimension. T désigne la période du battement (sans dimension) et Λ, la longueur de l'onde métachrone sans dimension. L'échelle de la vitesse adimensionnelle est indiquée par le code couleur.

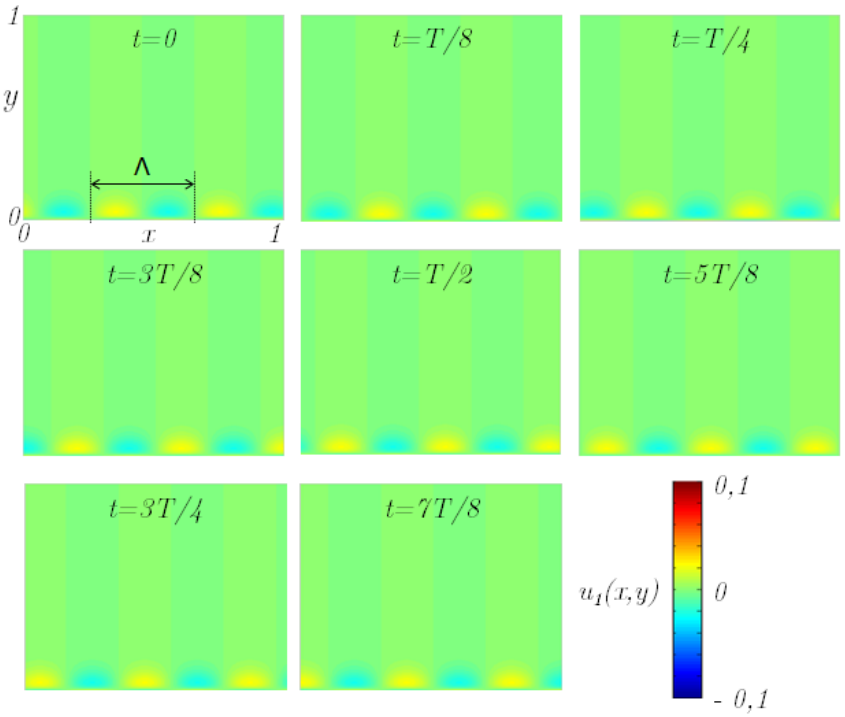
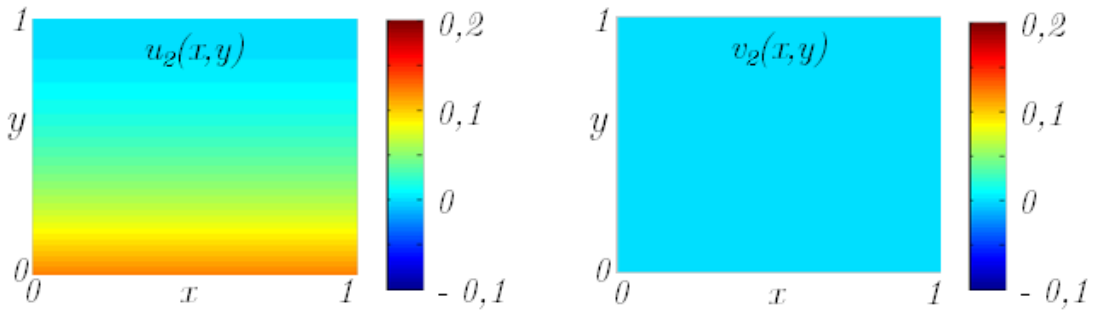


FIGURE 7.2 – **Premier ordre du champ de vitesses verticale du fluide**. Les positions x et y, le premier ordre de la vitesse vertical du fluide v_1 et le temps t sont sans dimension. T désigne la période du battement (sans dimension) et Λ, la longueur de l'onde métachrone sans dimension. L'échelle de la vitesse adimensionnelle est indiquée par le code couleur.

7.2 Second ordre du champ de vitesses

En §6.3.3, nous avons choisi de ne calculer que la partie constante du second ordre du champ de vitesses. En effet, le premier ordre étant uniquement oscillant, la partie oscillante du second ordre est forcement plus petite que celle du premier ordre. Ce second ordre, qui n'a qu'une composante horizontale, est calculé à partir du système d'équations (6.69) et est présenté en figure 7.3.



(a) Second ordre de la vitesse horizontale du fluide

(b) Second ordre de la vitesse verticale du fluide

FIGURE 7.3 – **Second ordre du champ de vitesses du fluide**. Les positions x et y, les second ordres horizontal u_2 et vertical v_2 de la vitesse du fluide et le temps t sont sans dimension. L'échelle de la vitesse adimensionnelle est indiquée par le code couleur.

7.3 Champ de vitesses global

Le champ de vitesses global correspond à la somme des premier et second ordres du champ de vitesses (Eq.(6.71)). Le premier ordre du champ de vitesses est responsable de la contribution oscillante du champ de vitesses global alors que le second ordre correspond à la contribution constante (Fig. 7.4). La composante verticale du champ de vitesses global correspond donc au premier ordre du champ de vitesses vertical vu que le second ordre constant du champ de vitesses vertical est nul (Fig. 7.5).

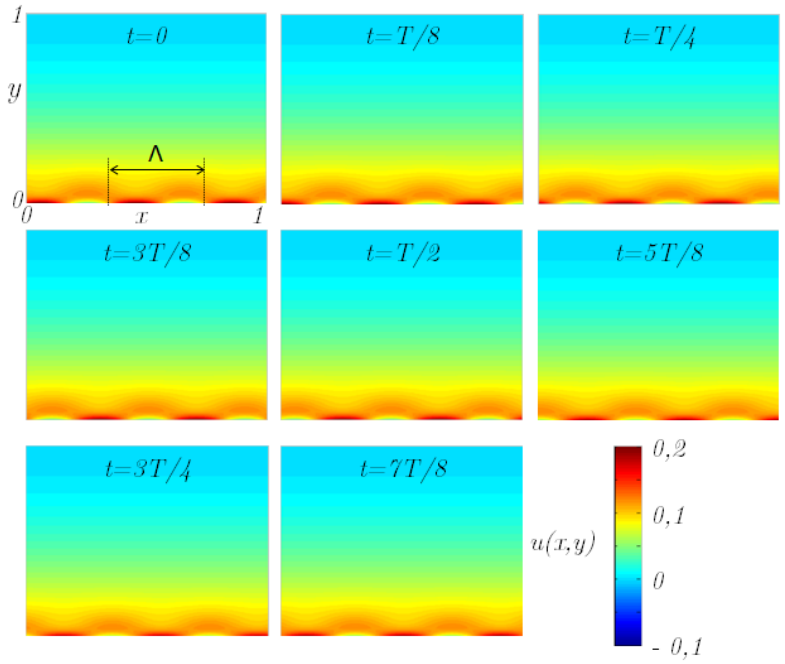


FIGURE 7.4 – **Champ de vitesses horizontal du fluide**. Les positions x et y, la vitesse horizontale du fluide u et le temps t sont sans dimension. T désigne la période du battement (sans dimension) et Λ, la longueur de l'onde métachrone sans dimension. L'échelle de la vitesse est indiquée par le code couleur. FBC= $8,4$ Hz, ABC= $7,0$ µm, LOOM= $14,2$ µm, $h = 40,7$ µm, $\phi = 0,0$ µm.

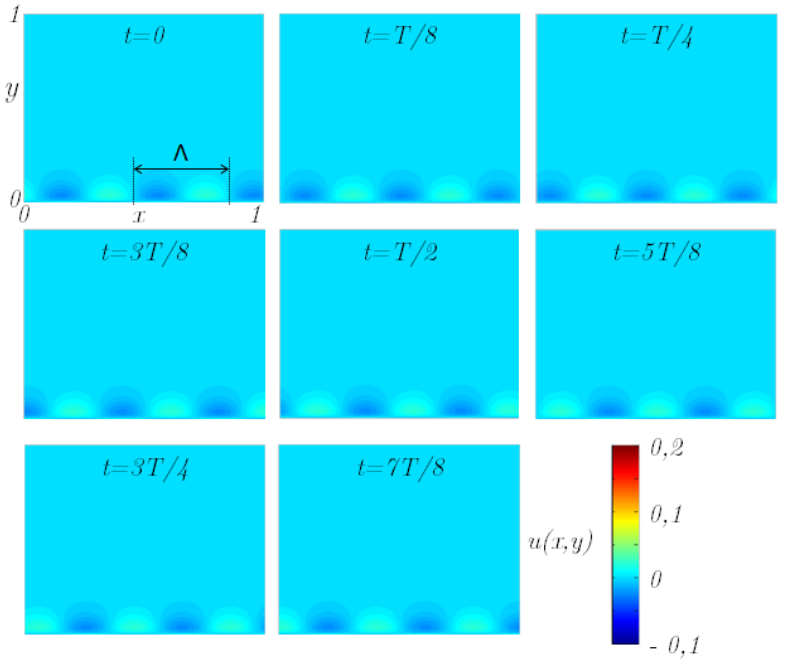


FIGURE 7.5 – **Champ de vitesses vertical du fluide**. Les positions x et y, la vitesse horizontale du fluide v et le temps t sont sans dimension. T désigne la période du battement (sans dimension) et Λ, la longueur de l'onde métachrone sans dimension. L'échelle de la vitesse est indiquée par le code couleur. FBC= $8,4$ Hz, ABC= $7,0$ µm, LOOM= $14,2$ µm, $h = 40,7$ µm, $\phi = 0,0$ µm.

7.4 Trajectoire des microbilles

Le modèle permet de simuler la trajectoire des microbilles en fonction de l'altitude de leur point de départ. On peut voir (Fig. 7.6) que les trajectoires sont légèrement oscillantes à proximité de la paroi ciliée et devienne rapidement rectiligne lorsque la distance entre les microbilles et la paroi ciliée augmente.

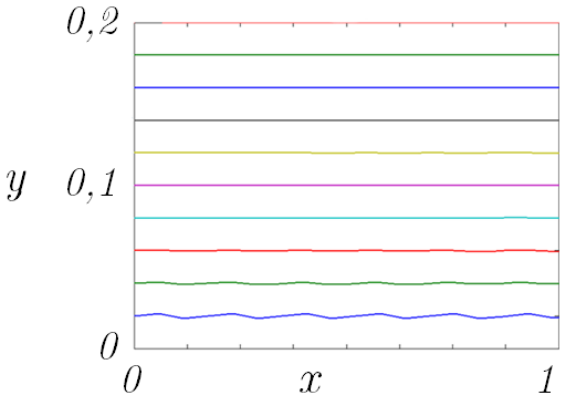


FIGURE 7.6 – **Trajectoires des particules à plusieurs altitudes d'insertion dans le courant généré par les cils**. L'espace x, y est sans dimension. L'abscisse x est représenté sur 6 longueurs d'onde adimensionnelles.

7.5 Vitesse des microbilles en fonction de la distance

La vitesse des microbilles U_{eff} donnée par l'équation (6.76) apparait comme une fonction de la distance entre les microbilles et la paroi ciliée (Fig. 7.7). Les oscillations du champs de vitesses proches de la paroi ciliée réduisent légèrement la vitesse des microbilles. Sortie de ces perturbations, la vitesse des microbilles suit une décroissance parabolique en fonction de la distance microbille-cils.

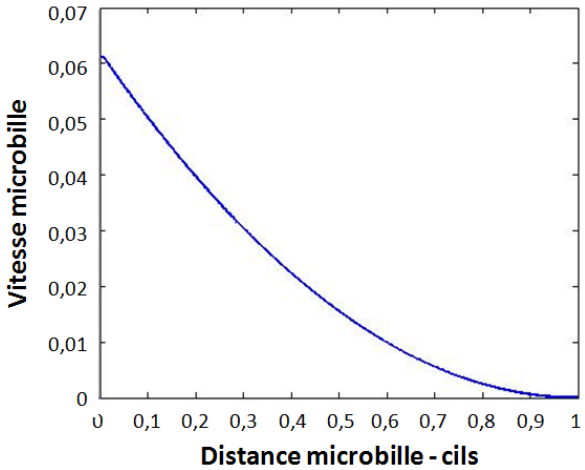
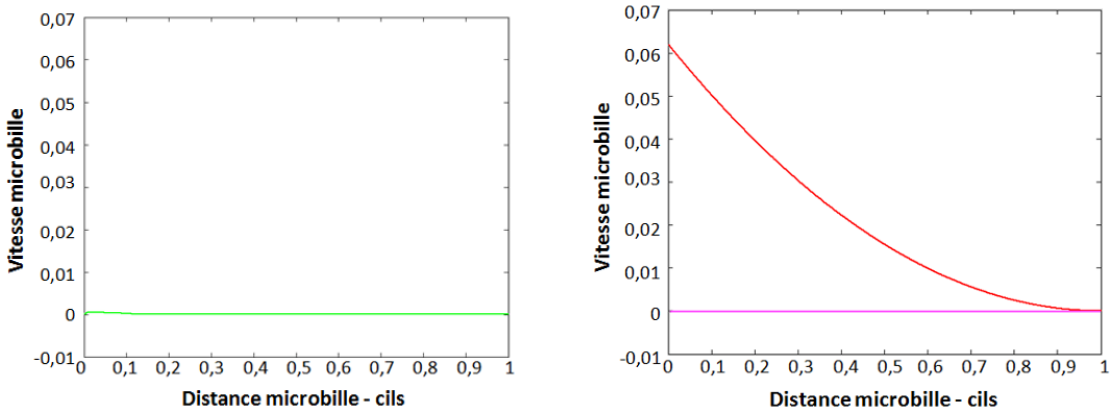


FIGURE 7.7 – **Vitesse U_{eff} des microbilles en fonction de la distance entre les microbilles et la paroi ciliée**. La vitesse U_{eff} et la distance microbille-cils sont sans dimension. Pour cette simulation, la longueur de glissement Φ est égale à 0.

7.5.1 Contribution des différents ordres de la vitesse du fluide sur la vitesse des microbilles.

Le second ordre de la vitesse horizontale $u_2^s(y)$ est la somme d'une fonction parabolique et d'une fonction exponentielle (Eq.(6.69)).

$$u_2^{(s)} = A_2\ y^2 + B_2\ y + C_2 - 4\alpha^4 k \left[\mathrm{Re}\left(A_1 \bar{B}_1\ \frac{e^{-(k+\bar{\gamma}_1)y}}{(k+\bar{\gamma}_1)^2} \right) + |B_1|^2\ \frac{e^{-(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)y}}{(\gamma_1+\bar{\gamma}_1)^2} \right] \tag{7.1}$$



(a) Contribution du premier ordre (en ε) de la vitesse du fluide à la vitesse des microbilles

(b) Contribution du second ordre (en ε) de la vitesse du fluide à la vitesse des microbilles. La ligne rouge représente la contribution du terme parabolique et la ligne violette la contribution du terme exponentielle.

FIGURE 7.8 – **Contribution des différents ordres de la vitesse du fluide à la vitesse des microbilles**. La vitesse U_{eff} et la distance microbille-cils sont sans dimension. Pour cette simulation, la longueur de glissement Φ est égale à 0.

Dans la gamme physiologique des paramètres, on peut voir sur la figure 7.8 que le premier ordre (en vert) n'apporte que de faibles perturbations sur les premiers microns de la hauteur du fluide pour rapidement s'annuler lorsque la distance avec les cils augmente. La partie exponentielle du second ordre (en violet) est quasi nulle quelque soit la distance. Le modèle prédit donc que le profil de vitesse des microbilles dépend presque exclusivement de la contribution parabolique du terme de second ordre de la vitesse du fluide (en rouge). Cette part parabolique sous sa forme adimensionnelle s'écrit :

$$u(y) = \frac{\epsilon^2}{2}\left(A_2 y^2 + B_2 y + C_2 \right) \tag{7.2}$$

et peut être réécrite sous une forme dimensionnée :

$$u^{s*}(y^* = yh) = \omega h\ u(y) = \omega h\ \frac{a^2}{2h^2}\left(\frac{A_2}{h^2} y^{*2} + \frac{B_2}{h} y^* + C_2 \right) \tag{7.3}$$

7.5.2 Calcul de la valeur de la vitesse à la paroi ciliée (cas limite)

Dans nos expériences (§5.3), les valeurs de k et de α sont respectivement 10 et 0,4. On peut donc étudier le cas limite où $e^{-k} \ll 1$ et $\alpha \ll 1$. Reprenons les coefficents du second ordre (en ε) de la vitesse du fluide (Eq.(6.68)), dans ce cas limite, G_1 et G_2 sont négligeable comparé à G_3, et les coefficients du profil parabolique deviennent :

$$A_2 = -\frac{G_3}{1+2\phi} \quad , \quad B_2 = \frac{2G_3}{1+2\phi} \quad , \quad C_2 = -\frac{G_3}{1+2\phi} \tag{7.4}$$

Ce qui nous donne le champ de vitesses horizontal :

$$\begin{aligned} u(y) &= -\frac{G_3}{1+2\phi}\, y^2 + \frac{2G_3}{1+2\phi}\, y - \frac{G_3}{1+2\phi} \\ &= -\frac{G_3}{1+2\phi}\, (y-1)^2 \end{aligned} \tag{7.5}$$

On retrouve ici un profil parabolique respectant les conditions limites de vitesse et de contrainte de cisaillement nulles en $y = 1$ (soit en $y^* = h$). De plus, à partir de Eq.(6.66), le terme en $4\alpha^4 k$ dans G_3 peut être négligé, ce qui nous donne l'expression suivante :

$$G_3 \approx -k - C = -k - \beta k - \beta(1-\beta)\ \mathrm{Re}(\gamma_1) \approx (\beta^2 - 2\beta - 1)k \tag{7.6}$$

La vitesse sans dimension à la paroi ciliaire se réduit dans ce cas à :

$$U_0 \approx \frac{\varepsilon^2}{2}\left(\frac{1+2\beta-\beta^2}{1+2\phi}\right) k \approx \frac{\varepsilon^2}{2}\left(\frac{2-(\beta-1)^2}{1+2\phi}\right) k \tag{7.7}$$

et sous sa forme dimensionnée :

$$U_0^* \approx \frac{a^2\omega\pi}{\lambda}\left(\frac{2-(\beta-1)^2}{1+2\dfrac{\Phi}{h}}\right) \tag{7.8}$$

7.5.3 Effet de la variation des paramètres sur la vitesse des microbilles

Le modèle numérique permet de faire varier un seul paramètre du battement ciliaire en fixant tous les autres. Afin de quantifier l'évolution de la vitesse des microbilles en fonction de la variation des paramètres, on définit U_0^* la vitesse des microbilles à la paroi ciliée ($y = 0$). Pour chaque paramètre (FBC, ABC, LOOM λ, longueur de glissement Φ et hauteur du fluide h), nous simulons une augmentation et une diminution de la valeur par rapport à une valeur de référence (tableau 7.1). Cette valeur de référence correspond, pour chaque paramètre, à la valeur moyenne mesurée en §5.3 sauf pour Φ où en absence de valeurs de référence nous avons choisi un peu arbitrairement 3 valeurs, nous fixons $\Phi = 0$, correspondant à la condition de transfert parfait et 2 valeurs croissantes de "transfert imparfait" choisies pour arriver à des valeurs de vitesses relativement proches de celles observées dans la partie expérimentale. La plage de variations appliquée ici permet de rester dans la gamme physiopathologique des valeurs.

TABLEAU 7.1 – **Impact de la variation d'un paramètre sur la vitesse des microbilles à la paroi ciliée U_0^*.**

Variations	FBC (Hz)	ABC (µm)	λ (µm)	Φ (µm)	h (µm)	U_0^* (µm.s^{-1})
FBC ↗	12,6					121,8
Référence	8,4	7,0	14,2	25,0	40,7	81,2
FBC ↘	4,2					40,6
ABC ↗		10,5				170,6
Référence	8,4	7,0	14,2	25,0	40,7	81,2
ABC ↘		3,5				23,9
λ ↗			21,3			54,1
Référence	8,4	7,0	14,2	25,0	40,7	81,2
λ ↘			7,1			162,4
Φ ↗↗				50,0		52,4
Φ ↗	8,4	7,0	14,2	25,0	40,7	81,2
Référence				0,0		181,0
h ↗					61,1	99,5
Référence	8,4	7,0	14,2	25,0	40,7	81,2
h ↘					20,4	52,4

(↘ indique une diminution par rapport à la valeur de référence. ↗ indique une augmentation par rapport à la valeur de référence. La ligne qui montre une diminution est écrite en rouge alors que la ligne montrant une augmentation est écrite en vert. U_0^* est la vitesse des microbilles simulée à la paroi.)

On peut donc voir qu'une augmentation de la FBC, de l'ABC et de la hauteur de fluide h augmente la valeur de la vitesse des microbilles à la paroi alors qu'une augmentation de la LOOM et de Φ se traduit par une diminution de cette vitesse. On peut remarquer que pour les valeurs de paramètres présentes dans le tableau 7.1, les valeurs de U_0^* obtenues à partir de l'équation (7.8) sont à quelques centièmes de $\mu m.s^{-1}$ près égales aux valeurs de U_0^* obtenues avec le modèle

complet (Eq.(7.1)).

L'effet de la FBC apparaît linéaire sur la vitesse à la paroi, une diminution et une augmentation de 50% se traduisent par un effet similaire sur U_0^*. Cet effet est compatible avec le cas limite Eq.(7.8) où la vitesse est directement proportionnelle à la FBC.

Une diminution de 50% de l'ABC se traduit par une vitesse qui correspond à 30% de la valeur de référence alors qu'une augmentation de 50% se traduit par un doublement de la vitesse. L'effet de la variation de l'ABC n'est donc pas linéaire. Le cas limite Eq.(7.8) permet de voir que la vitesse à la paroi serait proportionnelle à $(ABC + 1)^2$.

Contrairement aux deux premiers paramètres, une augmentation de la LOOM λ se traduit par une diminution de la vitesse. L'effet n'est pas linéaire. Une diminution de 50% de λ multiplie par 2 la vitesse à la paroi la où l'augmentation ne crée qu'une diminution de 30% de la vitesse. Le cas limite Eq.(7.8) montre que la vitesse à la paroi serait inversement proportionnelle à la LOOM.

Sans valeur de comparaison, nous avons choisi $\Phi = 0$ comme référence, ce qui correspond à un transfert parfait de la quantité de mouvement entre le mur cilié et le fluide. Comme attendu, une augmentation de Φ engendre une perte de transfert et donc diminue la vitesse au mur. Le cas limite Eq.(7.8) montre que la relation qui relie U_0^* et Φ serait inversement proportionnelle.

La distance h a une relation presque linéaire avec la vitesse des microbilles à la paroi. Le cas limite Eq.(7.8) montre que h intervient au niveau de l'expression de Φ. Si intuitivement l'effet des autres paramètres semble assez facile à comprendre cela est moins vrai pour h. L'accroissement de la vitesse à la paroi avec l'accroissement de h peut sans doute être compris en supposant que plus les cils sont capables de générer une vitesse importante à la paroi, plus ils vont mobiliser une épaisseur importante de fluide.

7.5.4 Effets des paramètres de l'ellipse

L'ellipse qui modélise la pointe du cil est définie par les paramètres a et β. Le grand axe $2a$ est directement obtenu à partir de l'amplitude du battement ciliaire. Le paramètre β qui permet de définir le petit axe $2a\beta$ de l'ellipse est quand à lui plus difficile à déterminer sur l'ensemble des brossages. En §5.6, nous avons pu mesurer la variation moyenne de la hauteur de la pointe du cil pendant un cycle de battement. C'est pourquoi nous avons choisi de fixer ce petit axe à 1 µm pour l'ensemble de nos modélisations (c.a.d. $\beta = 1\mu m/(2a)$). La figure 7.9 présente la superposition de la trajectoire "cadre" (§5.6) sur l'ellipse utilisée pour le calcul du modèle numérique. Comme on peut le voir l'hypothèse d'un petit axe à 1 µm semble (en terme d'amplitude) raisonnable.

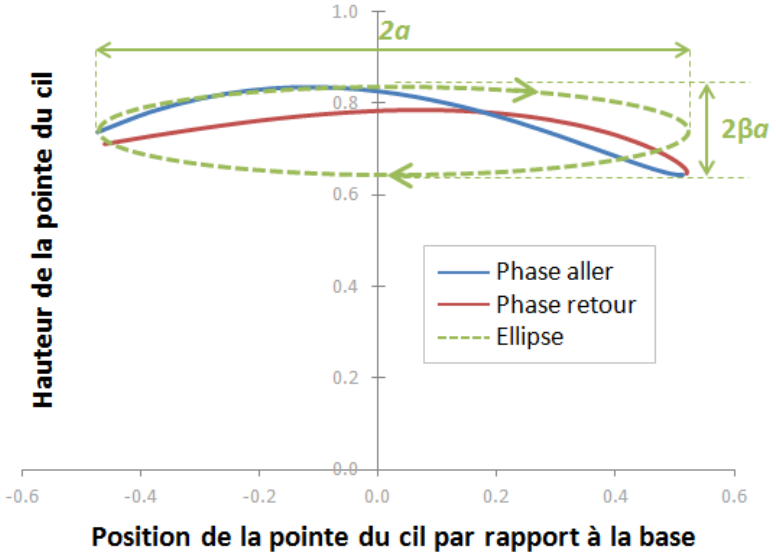


FIGURE 7.9 – **Modélisation elliptique de la trajectoire du cil durant un cycle de battement**. La hauteur de la pointe du cil (sans dimension) est tracée en fonction de la distance entre la pointe du cil et la normale passant par la base du cil (sans dimension). La phase aller est en bleu, la phase retour est en rouge et l'ellipse est en vert. $2a$ est le grand axe de l'ellipse et $2\beta a$ le petit axe. Le sens de rotation de l'ellipse est indiqué par les flèches vertes.

On a vu que le cas limite où $e^{-k} \ll 1$ et $\alpha \ll 1$, qui correspond à nos sets de paramètres physiologiques et physiopathologiques, permet de décrire la vitesse à quelques centièmes de $\mu m.s^{-1}$ près (§7.5.3). On peut donc utiliser les équations (7.7) pour décrire les effets de la variation de β (donc de la forme de l'ellipse) sur la vitesse. La figure 7.10 présente l'évolution de la vitesse U_0 en fonction de β pour $\phi = 0$ et ε fixé.

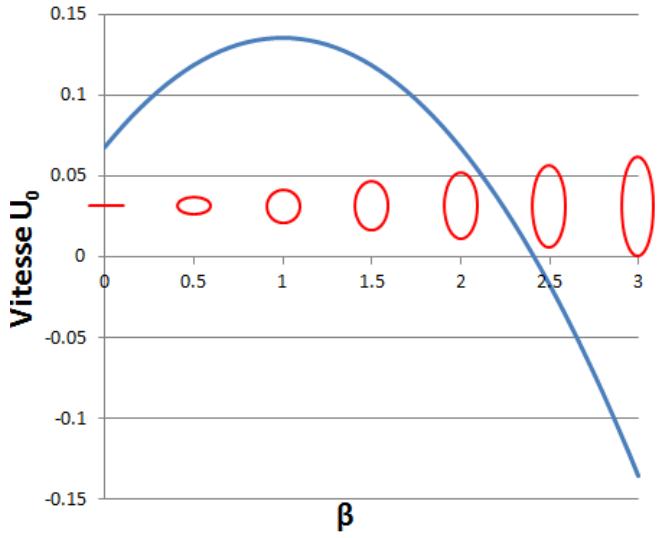


FIGURE 7.10 – **Effet de la variation β sur la vitesse du mur cilié U_0.** La vitesse U_0 et β sont sans dimension. La vitesse U_0 est représentée en bleu. Pour a fixe, les ellipses rouges représentent la forme du battement ciliaire en fonction des valeurs de β.

Quand $\beta = 0$, cas qui correspond à la limite d'un mouvement plat horizontal de la pointe du cil, la vitesse est $U_0 = \varepsilon^2 k/(2(1+2\phi))$. Lorsque β croit cette vitesse croit jusqu'à un maximum lorsque $\beta = 1$. Dans ce cas, le mouvement de la pointe du cil devient parfaitement circulaire et $U_0 = \varepsilon^2 k/(1+2\phi)$. On peut remarquer que les valeurs de β proche de 1 semblent plus compatibles avec le mouvement décrit par [Sanderson and Sleigh, 1981, Sleigh et al., 1988] en figure 5.17). Au delà de $\beta = 1$, la vitesse décroit (c.a.d., lorsque l'ellipse tends à s'aplatir verticalement) et devient négative pour $\beta \geq 1 + \sqrt{2}$. Dans ce dernier cas, le fluide va dans la même direction que l'onde métachrone. Les grandes valeurs de β ($\gg 2$ ou 3) ne semblent pas d'un point de vue physiologique ou physio-pathologique très réaliste. Une grande valeur de β signifie, si l'on veut que la longueur du cil reste à peu près constante à 6 µm, que la valeur de l'axe horizontal de la parabole ($2a$ théoriquement le grand axe) se réduise. Dans ce cas le déplacement de l'extrémité du cil tend à ne se faire que sur l'axe verticale ce qui dans la mesure de nos connaissances n'est pas quelque chose qui a déjà été observé. Dans le cadre des expériences effectuées dans cette thèse, et avec toutes les précautions qu'il faut prendre sur la détermination de l'amplitude verticale du battement ciliaire, nous obtenons un β de l'ordre de 0,14.

Troisième partie

Comparaison entre l'évaluation du battement ciliaire expérimentale et les simulations numériques

8 | Comparaison entre l'analyse du battement ciliaire et les résultats du modèle numerique

8.1 Paramètres d'entrée du modèle numérique

Le modèle numérique nécessite 5 paramètres d'entrée : la fréquence du battement ciliaire (FBC), l'amplitude de battement ciliaire (ABC), la longueur d'onde de l'onde métachrone λ, la hauteur de fluide h et la longueur de glissement Φ. La FBC, l'ABC et λ sont mesurés directement à partir de l'analyse du battement ciliaire sur les films de VMHV. La hauteur de fluide h et la longueur de glissement Φ doivent donc être déterminés à partir de nos données expérimentales.

8.1.1 Hauteur de fluide h

Le modèle numérique prédit que la vitesse des microbilles varie selon une parabole décroissante en fonction de la distance entre les microbilles et les cils (Fig. 7.7). Pour chaque bordure, la hauteur de fluide h peut donc être facilement déterminée à partir des données de suivi de microbilles en utilisant une régression parabolique sur la vitesse des microbilles. Cette hauteur de fluide h correspond à la distance à laquelle la régression parabolique coupe l'axe x et donc là où la vitesse des microbilles s'annule. Si l'on définit U_w^*, la vitesse des microbilles au mur cilié, alors l'équation de la parabole est :

$$u^*(y^*) = \frac{U_w^*}{h^2}(y^* - h)^2 \tag{8.1}$$

où y^* est la distance microbille-cils. A partir de l'équation de cette parabole, on peut déterminer, pour chaque bordure ciliée, la valeur de la vitesse à la paroi U_w^* et de la hauteur de fluide h. Pour chaque microbille, la relation entre la vitesse et la distance microbille-cils définit par le couple (U_b^*, L_b^*) (voir §5.4), peut être présentée sous forme adimensionnée selon :

$$U_b = \frac{U_b^*}{u_w^*} \qquad \text{et} \qquad L_b = \frac{L_b^*}{h} \tag{8.2}$$

Cette adimensionnent permet de tracer une courbe générale (Fig 8.1) de la vitesse moyenne en fonction de la distance microbille-cils moyenne pour l'ensemble des microbilles. Avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,78$, la régression parabolique confirme la forme général de la relation et la décroissance de la vitesse avec les valeur croissante de la distance déjà observée en §5.4 (Fig. 5.4(a)).

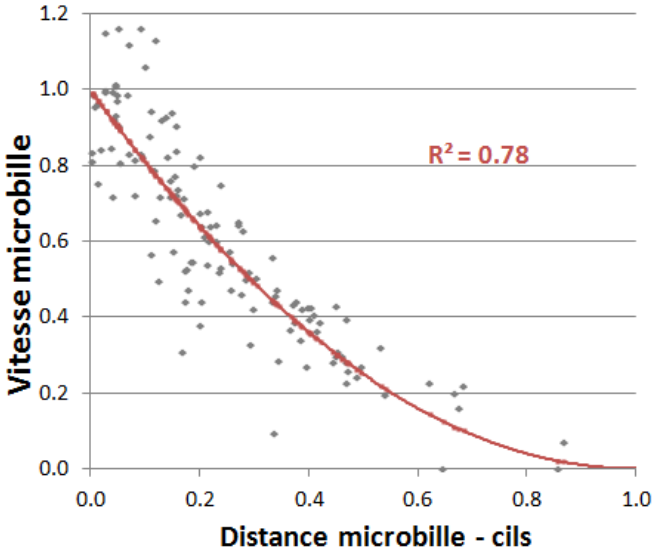


FIGURE 8.1 – **Courbe générale de la vitesse des microbilles en fonction de la distance microbille-cils**. Chaque point représente une microbille. La vitesse des microbilles U_b et la distance microbille-cils L_b sont adimensionée respectivement par U_w^* et h. La courbe rouge représente la régression parabolique ($U_b = (1 - L_b)^2$) avec le coefficient de détermination R^2 correspondant.

8.1.2 Longueur de glissement Φ

Finalement, la longueur de glissement Φ est le seul paramètre, nécessaire pour la simulation de la vitesse des microbilles, qui ne peut pas être directement mesuré à partir des données expérimentales. [Sbragaglia and Prosperetti, 2007] ont montré que la longueur de glissement effective produite par une frontière solide sans glissement avec une distribution de zone de glissement parfait (Figure 8.2) était proportionnelle au produit de la longueur caractéristique des zones de glissement par la fraction de surface couverte par ces zones de glissement.

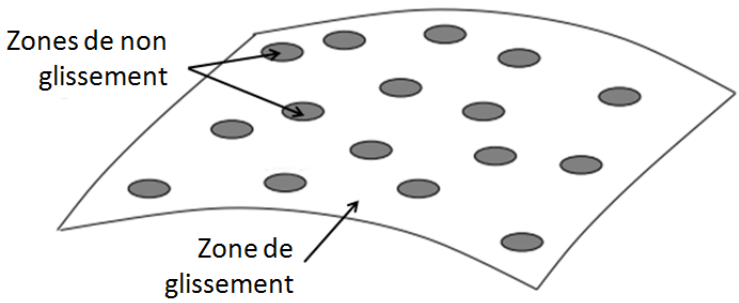


FIGURE 8.2 – **Enveloppe présentant une frontière solide sans glissement avec distribution de zones de glissements**. Les cercles gris représentent la pointe des cils. Modifié de [Sbragaglia and Prosperetti, 2007].

Dans le cas de notre modèle "enveloppe", les surfaces des pointes de cils pourraient être vues comme des zones de non glissement alors que les espaces entre les cils pourraient être vues comme des zones de glissement parfait. La longueur caractéristique des zones de glissement serait donc proportionnelle à l'espace entre deux cils d_c (défini par l'équation (4.6)) et la fraction de surface couverte par les zones de glissement sera proportionnelle à la fraction d'aire occupée par les cils f_c (définie par l'équation (4.5)). On peut donc s'attendre à ce que une valeur de Φ soit proportionnelle au produit $f_c \times d_c$, c.a.d, à $(1-\rho_c)^2/\rho_c$.

Relation entre longueur de glissement Φ et densité de cils ρ_c Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mis en place une procédure déterminant la longueur de glissement "Φ ajustée" qui permettait la meilleure corrélation entre la régression parabolique sur la vitesse des microbilles obtenue par suivi de microbilles (Eq.(8.1)) et la vitesse de microbilles obtenue par simulation numérique(Eq.(6.76)). La figure 8.3 où "Φ ajustée" est porté en fonction de ρ_c présente le résultat de cette procédure. Une technique de régression conduit alors à la relation suivante entre Φ and ρ_c avec un coefficient de détermination R^2 de 0,62 :

$$\Phi \approx \Phi_{\text{calc}}(\rho_c) = \Upsilon \frac{(1-\rho_c)^2}{\rho_c} \qquad \text{où} \qquad \Upsilon = 745\ \mu m \tag{8.3}$$

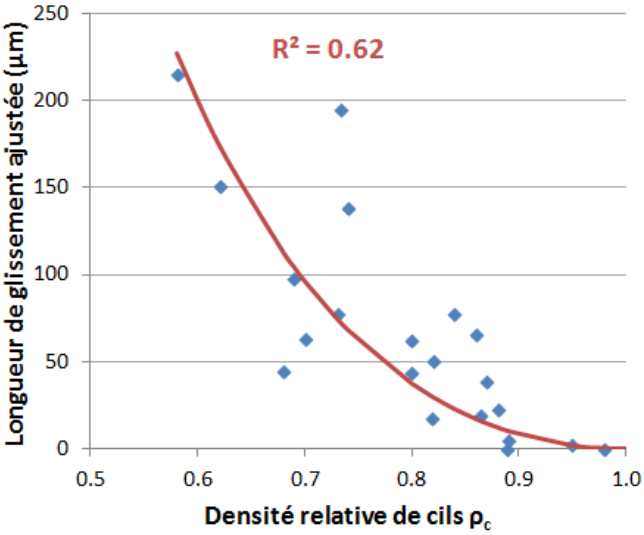
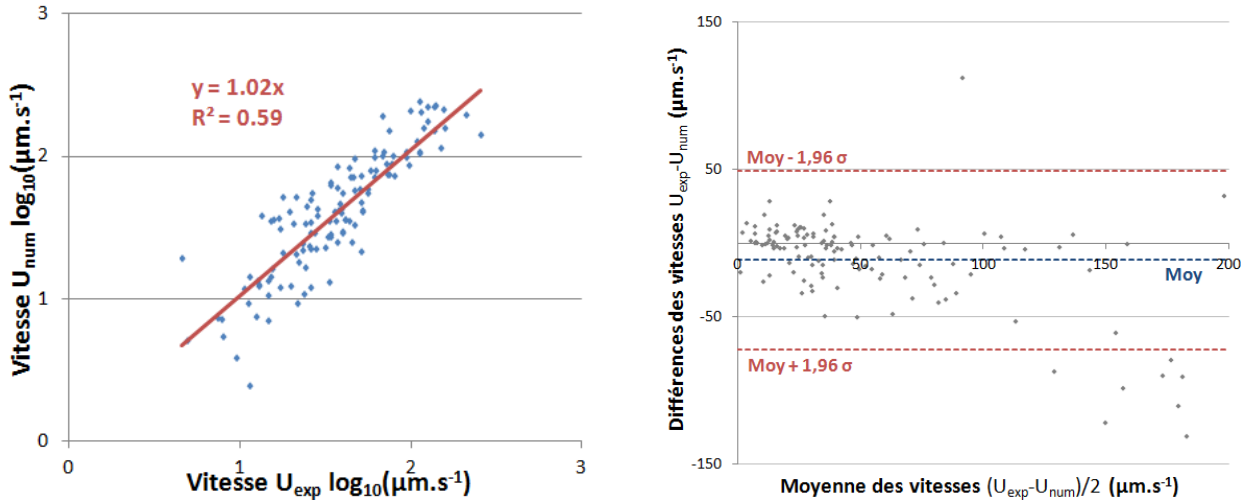


FIGURE 8.3 – **Relation entre la longueur de glissement et la densité relative de cils**. Les carrés bleus représentent les points de données et la courbes rouge la régression en $(1-\rho_c)^2/\rho_c$.

8.2 Comparaison de vitesses des microbilles expérimentales et simulées

On peut maintenant comparer la vitesse des microbilles obtenues à partir du suivi de microbilles avec la vitesse obtenue par simulations. Ces simulations intègrent les 4 paramètres calculés à partir de l'analyse du battement ciliaire : FBC, ABC, λ et Φ_{calc} ainsi que la hauteur de fluide h mis en mouvement lors de l'expérience de suivi de microbilles. Ainsi à chaque microbille, qui est expérimentalement définie par la distance D_{exp} moyenne entre la microbille et la paroi ciliée et la vitesse mesurée U_{exp} peut être associée la vitesse U_{num} calculée numériquement par le modèle.

La vitesse U_{exp} est représentée en fonction de la vitesse U_{num} (Fig. 8.4(a)). Le coefficient de détermination R^2 entre ces deux vitesses est de 0,59 et la pente de régression est égale à 1,02. Le graphique de Bland-Altman (Fig. 8.4(b)) représente la différence entre les deux vitesses en fonction de la moyenne des deux valeurs, c.a.d., chaque point correspond à $((U_{\text{exp}} + U_{\text{num}})/2; U_{\text{exp}} - U_{\text{num}})$. Sur cette figure, on trouve également que les vitesses expérimentales sont en bon accord avec les vitesses numériques. Pour rappel, la corrélation entre la vitesse des microbilles et les autres paramètres (calculée en §5.5) était de 0,67. Cela prouve que ce modèle reproduit assez fidèlement la relation entre la vitesse du fluide et les caractéristiques du battement ciliaire.



(a) Vitesse U_{exp} en fonction de la vitesse U_{num} La courbe rouge indique la droite de régression linéaire.

(b) Graphique de Bland-Altman. La courbe bleu indique la valeur moyenne de $(U_{\text{exp}} + U_{\text{num}})/2$ et les courbes rouges la moyenne $\pm$ 1,96 écart-type (σ).

FIGURE 8.4 – **Comparaison entre la vitesse U_{exp} des microbilles mesurée par suivi de microbilles et la vitesse U_{num} prédite par le modèle numérique**.

8.3 Effets de la variation des paramètres du battement ciliaire sur l'efficacité du battement ciliaire

Le modèle prédit qu'une augmentation de l'ABC ou de la FBC augmente la vitesse des microbilles alors qu'une augmentation de Φ ou de λ diminue la vitesse des microbilles (tableau 7.1). Ces comportements semblent en accord avec les résultats de suivi de microbilles (Fig. 5.7, Fig. 5.9 et Fig. 5.11). Par contre, le modèle prédit une diminution de la vitesse lorsque la LOOM est augmentée alors que le suivi des microbilles (Fig 5.12) tend à montrer que la vitesse des microbilles est plus faible lorsque la LOOM est diminuée. Cette différence entre observations expérimentales et simulations peut probablement s'expliquer par le fait que si le modèle permet de faire varier chaque variable indépendamment les unes des autres, l'expérience est de ce point de vue plus limitée. Ainsi dans nos expériences, la diminution de la vitesse des microbilles observée en présence d'une LOOM diminuée est aussi associée à une densité relative de cils significativement réduite (et donc une longueur de glissement Φ augmentée). La décroissance de la LOOM pourrait être vue, ici comme une tentative d'adaptation visant à palier l'effet d'une densité réduite qui resterait néanmoins insuffisante pour compenser l'effet "densité".

9 | Index d'efficacité du battement ciliaire

Nous avons vu que la vitesse des microbilles dépend au moins en partie des paramètres du battement ciliaire et de la distance microbille-cils. Il est donc difficile de comparer 2 patients entre eux à partir de l'unique observation du transport de microbilles. On cherche donc un paramètre, à partir des données du suivi de microbilles, qui puisse être utilisé comme index du transport mucociliaire et donc comme index de l'efficacité du battement ciliaire.

9.1 Construction de l'index

A l'origine de la construction de l'index se trouve l'idée relativement simple que le battement ciliaire est d'autant plus efficace qu'il est capable d'entrainer une masse importante de fluide à grande vitesse, c.a.d., une grande quantité de mouvement. L'utilisation du théorème des quantités de mouvement nous a conduit à définir la contrainte exercée par les cils sur le fluide. Plus cette contrainte est élevée et plus les cils devrait être capables de générer un mouvement important de fluide. En cela cette contrainte peut être vue comme un index d'efficacité du battement ciliaire.

Considérons le "volume" V (Fig. 9.1) défini par :

$$\begin{cases} X_0 \leq x^* \leq X_0 + L \\ 0 \leq y^* \leq h \\ 0 \leq z^* \leq H \end{cases} \tag{9.1}$$

La forme générale de l'équation de conservation de la quantité de mouvement [Comolet, 1976] pour ce volume V limité par la surface S ($S = S_1 \cup S_2 \cup S_3 \cup S_4 \cup S_5 \cup S_6$) se résume pour un écoulement stationnaire et incompressible à :

$$\frac{d}{dt}\iiint_V \rho u^s dV + \iint_S (\rho u^s)\vec{u^s}.\vec{n}ds = 0 = \sum \vec{F} = \iint_S -Pnds + \iiint_V \rho g dV + \iint_S \sigma^s \ nds \tag{9.2}$$

L'écoulement est uniquement dans la direction de x^* alors que les forces de volume liées à la

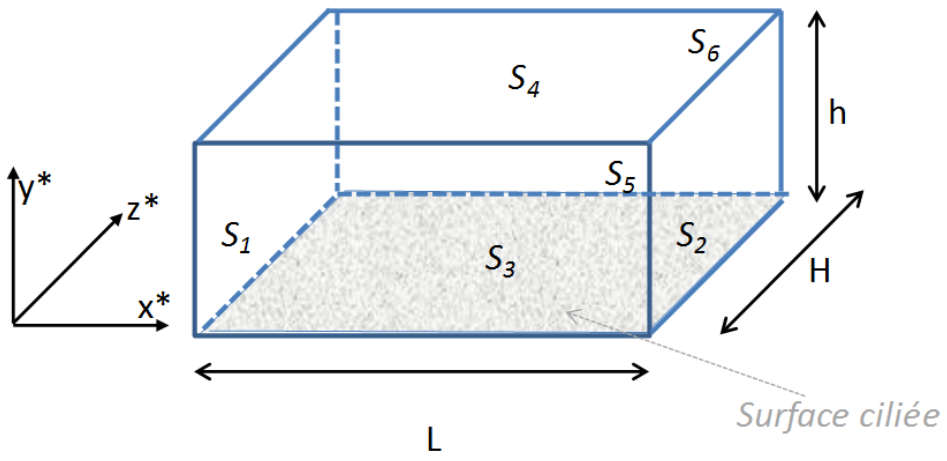


FIGURE 9.1 – **Schéma du volume de fluide mis en mouvement par le battement ciliaire**.

gravité ne s'exerce que dans la direction de z^*. Il vient :

$$0 = \iint_{S_1 \cup S_2} -P^s n ds + \iint_{S_1 \cup S_2 \cup S_3 \cup S_4} \sigma^s \ n ds \tag{9.3}$$

Où P^s est la composante stationnaire de la pression liée à l'écoulement et σ^s le tenseur des contraintes visqueuses du fluide. Le modèle prédisant que le gradient de pression le long de la direction x, $(p^{s*}_{2,x})$, est constant, l'équation (9.3) devient :

$$0 = hH\Big[P^s(x) - P^s(x+L)\Big] = -hHLp^{s*}_{2,x} + \iint_{S_1 \cup S_2 \cup S_3 \cup S_4} \sigma^s \ n ds \tag{9.4}$$

la vitesse du fluide étant selon l'axe x^* et ne dépendant que de y^* le tenseur des contraintes visqueuses se réduit à ses composantes tangentielles :

$$\begin{cases} \sigma_{xx} = \sigma_{yy} = 0 \\ \sigma_{xy} = \sigma_{yx} = \mu \dfrac{\partial U}{\partial y} \end{cases} \tag{9.5}$$

le modèle précisant qu'il n'y a pas de contrainte dans le fluide en y= h il vient :

$$0 = -hHLp^{s*}_{2,x} + \iint_{S_3} \sigma^s \ n ds = -hHLp^{s*}_{2,x} + HL\sigma^s_{xy}\Big|_{(y^*=0)} \tag{9.6}$$

Où $\sigma^s_{xy}\Big|_{(y^*=0)}$ est par définition la contrainte de cisaillement exercée par la surface ciliée sur le fluide que nous appellerons par la suite τ^*_w.

On a vu en Eq.(8.1) que la vitesse des microbilles $U^*(y^*)$ peut être assimilée à une parabole :

$$U^*(y^*) = \frac{U_w^*}{h^2}(y^* - h)^2 \tag{9.7}$$

D'autre part dans la gamme physiologique des paramètres, on a vu que la vitesse du fluide $U(y)$ calculée par le modèle se réduit presque exclusivement à la partie parabolique de $u_2^s(y)$ (§7.5.1).

$$U(y) = \frac{\varepsilon^2}{2}\left(A_2 y^2 + B_2 y + C_2\right) \tag{9.8}$$

Soit dans sa forme dimensionnée à :

$$U^{s*}(y^* = yh) = \omega h\ U(y) = \frac{a^2\omega}{2h}\left(\frac{A_2}{h^2}y^{*2} + \frac{B_2}{h}y^* + C_2\right) \tag{9.9}$$

En identifiant les termes en y^{*2} des équations (9.7) et (9.9), on obtient A_2 :

$$\begin{aligned} \frac{\omega a^2 A_2}{2h^3} &= \frac{U_w^*}{h^2} \\ A_2 &= \frac{2U_w^* h}{\omega a^2} \end{aligned} \tag{9.10}$$

A partir de l'équation (6.52), on sait que la composante constante du gradient de pression $p_{2,x}^{(s)}$ est :

$$p_{2,x}^{(s)} = \varepsilon^2 A_2 = \frac{2U_w^*}{\omega h} \tag{9.11}$$

et dans sa forme dimensionnée,

$$p_{2,x}^{(s)*} = \frac{\omega\mu}{h} p_{2,x}^{(s)} \tag{9.12}$$

Par conséquent,

$$p_{2,x}^{(s)*} = \frac{2\mu}{h^2} U_w^* \tag{9.13}$$

La contrainte de cisaillement exercé par le mur cilié sur le fluide est alors donnée en remplaçant la valeur de $p_{2,x}^{(s)*}$ dans l'équation (9.6) par l'expression donnée en (9.13) :

$$\tau_w^* = \sigma_{xy}^s\Big|_{(y^*=0)} = \frac{2\mu}{h} U_w^* \tag{9.14}$$

où U_w^* est la vitesse au niveau du mur cilié extrapolée à partir de la régression parabolique et h est la hauteur du fluide à laquelle la vitesse extrapolée par la régression parabolique s'annule. Ce résultat peut également être retrouvé à partir des équations (9.5) et (9.7) :

$$\tau_w^* = \sigma_{xy}^s\Big|_{(y^*=0)} = \mu\frac{\partial U^*(y^*)}{\partial y}\Big|_{(y^*=0)} = \frac{2\mu}{h} U_w^* \tag{9.15}$$

Je propose d'utiliser cette contrainte de cisaillement τ_w^* comme index pour évaluer l'efficacité du battement ciliaire. En utilisant le suivi de microbilles, on peut facilement extrapoler U_w^* et h. On retrouve en tableau 9.1, les valeurs d'index ainsi que les paramètres du battement ciliaire des 21 bordures à partir des 10 brossages ayant une analyse complète.

Tableau 9.1 – **Valeur des paramètres du battement ciliaire ainsi que de la vitesse des microbilles à la paroi et de l'index d'efficacité pour chaque des bordures ciliées**.

Patient №	n (microbilles)	FBC (Hz)	ABC (µm)	λ (µm)	Φ_{calc} (µm)	h (µm)	U_w^* (µm.s^{-1})	τ_w^* (mPa)
1	10	14,0	7,5	13,0	22,7	89,4	136,3	3,0
	8	15,0	6,8	14,6	16,0	84,6	202,9	4,8
	5	13,5	7,5	19,8	10,2	29,3	224,8	15,4
	5	13,6	4,0	28,0	30,1	90,2	39,9	0,9
2	4	5,3	7,0	10,8	71,8	82,8	26,0	0,6
	3	5,6	6,6	11,3	37,3	38,0	41,8	2,2
	11	6,3	7,3	11,0	112,2	33,2	50,8	3,1
3	7	14,0	5,4	10,5	103,8	52,9	54,0	2,0
4	6	11,5	7,5	12,0	68,1	74,8	70,9	1,9
5	7	7,3	7,8	16,0	226,6	74,1	24,9	0,7
	4	9,4	7,0	15,5	37,3	92,2	79,9	1,7
	3	4,9	8,4	17,3	12,2	53,9	64,3	2,4
	4	5,6	6,9	13,3	2,0	49,9	110,9	4,4
	5	8,1	6,7	15,4	29,4	141,3	85,0	1,2
6	4	3,7	6,2	16,7	10,1	30,1	39,6	2,76
7	5	7,7	7,2	12,0	95,8	38,3	47,4	2,5
8	3	3,6	6,3	17,7	0,3	32,3	49,4	3,1
9	14	7,7	8,8	12,1	173,5	60,5	49,2	1,6
	7	6,7	5,7	11,2	17,0	124,4	60,8	1,0
	7	6,6	7,0	10,3	74,4	50,9	48,6	1,9
10	5	6,7	6,5	10,4	14,5	48,1	65,0	2,7

(№ correspond au numéro du patient. n correspond au nombre de microbilles sur la bordure considérée. La longueur de glissement Φ_{calc} est calculée à partir de la mesure de la densité relative de cils (Eq.(8.3)). La hauteur de fluide h et la vitesse au niveau du mur cilié U_w^* sont extrapolée à partir de la régression parabolique sur la vitesse des microbilles (Eq.(8.1)). La contrainte de cisaillement exercée par les cils sur le fluide τ_w^* est calculée à partir de l'équation (9.14).)

9.2 Application de l'index de l'efficacité du battement ciliaire aux patients DCP

Dans le cadre d'une collaboration avec Sylvain Blanchon, certains paramètres du battement ciliaire ont été mesurés sur des patients dont le diagnostic de DCP était confirmé et certain. Le but de cette étude, qui fait l'objet d'un article actuellement soumis [Blanchon et al., 2016], est de décrire les paramètres du battement ciliaire en fonction de l'anomalie ultra-structurale des cils. Comme nous l'avons vu en §2.4.2, il existe 4 types principaux de défaut reconnu qui portent sur les bras de dynéine externes (BDE), sur les bras de dyneine internes (BDI), sur l'ensemble des deux bras de dynéine (2BD) et enfin sur le complexe central (CC). Enfin, à ces 4 types, il faut ajouter un cinquième "type" qui correspond à des patients dont l'analyse génétique confirme le diagnostic de DCP, mais chez qui les cils sont normaux en microscopie électronique (nME).

15 patients avec un diagnostic de DCP certain pour chacun de ces 5 types d'ultrastructure ont été recrutés, soit 75 patients au total. Chaque patient a subit un brossage nasal qui a été enregistré selon les protocoles précédemment décrit (§3.1 & 4.1) pour réaliser une analyse cinématique. Dans le cadre de cette étude, la FBC, l'ABC ont été mesurées pour chacun des films (soit 750 films). En revanche, pour des raisons de design d'étude clinique, cette étude, commencée bien avant le début de ma thèse (janvier 2010), n'incluait ni le suivi de microbilles, ni la détermination de la densité relative de cils ou de la LOOM que j'ai introduits.

Aussi afin de pouvoir tout de même simuler numériquement ces battements, j'utilise le pourcentage d'amas battant comme paramètre pour le calcul de la longueur de glissement. On considère ici qu'un cil qui ne bouge pas représente une zone de perte et on pose que la densité relative de cils ρ_c est égale au pourcentage d'amas battant. Ensuite j'ai fixé arbitrairement la LOOM à 14,2 µm ce qui correspond à la valeur moyenne des brossages décrit en §5.3). Enfin la hauteur de fluide h, qui est normalement déterminée à partir d'une régression parabolique entre la vitesse des microbilles et la distance entre les microbilles et les cils a été fixée arbitrairement à 40,7 µm (valeur moyenne mesurée en §5.4) .

La simulation a été réalisée pour chaque patient en utilisant la valeur moyenne de chacun des paramètres du battement calculée sur ses 10 films. On retrouve dans le tableau 9.2, la valeur moyenne et l'écart-type de chaque paramètre en fonction du phénotype.

TABLEAU 9.2 – **Paramètres mesurés du battement ciliaire et paramètres estimés par le modèle (vitesse à la paroi et index d'efficacité) pour les différents phénotypes de DCP**.

Phénotype ultrastructural	FBC (Hz)	ABC (µm)	Φ_{calc} (µm)	U_0^* (µm.s^{-1})	τ_0^* (mPa)
Normal	8,4 ± 3,7	6,9 ± 1,0	55,5 ± 59,5	74,9 ± 53,3	2,84 ± 3,07
2BD	0,0	0,0	∞	0,0	0,0
BDE	2,4 ± 1,6	5,0 ± 1,5	21289,5 ± 28416,6	0,7 ± 1,7	0,04 ± 0,08
BDI	5,9 ± 2,4	3,8 ± 1,2	18221,4 ± 28780,3	0,8 ± 1,0	0,04 ± 0,05
CC	6,6 ± 1,7	6,1 ± 2,2	399,8 ± 639,9	29,2 ± 41,2	1,46 ± 2,06
nME	10,5 ± 4,9	5,5 ± 1,9	7829,7 ± 18599,3	6,7 ± 9,1	0,34 ± 0,45

(La longueur de glissement Φ_{calc} est calculée à partir de la mesure de la densité relative de cils (Eq.(8.3)). La vitesse au niveau du mur ciliée U_0^* et la contrainte de cisaillement exercée par le mur ciliée sur le fluide τ_0^* sont calculés respectivement à partir des équations (7.8) et (9.14). La ligne "ultrastructure normale" correspond aux paramètres des 10 brossages présentés tableau 9.1.)

Pour le phénotype 2BD, aucun cil n'est mobile. Par conséquent, la vitesse U_0^* et la contrainte τ_0^* sont nulles et significativement inférieures aux valeurs des autres phénotypes. Les phénotypes BDE et BDI ont un index d'efficacité très dégradé et très proche, ce qui est compatible avec les observations cliniques de ces deux phénotypes. On peut noter que le phénotype CC semble avoir l'efficacité la moins dégradée. La valeur de la contrainte du phénotype CC est d'ailleurs significativement plus grande que les phénotypes BDE et BDI. Malgré une FBC supérieure au seuil de 7,7 Hz défini par [Papon et al., 2012], on peut voir que le phénotype nEM présente néanmoins un index d'efficacité très faible. Ces résultats sont en accord avec le fait bien connu des cliniciens spécialistes de la DCP : le diagnostic de la DCP ne peut pas être basé uniquement sur la fréquence.

9.3 Discussion de l'index

Au contraire de l'analyse du battement ciliaire [Papon et al., 2012] ou de l'évaluation de la forme du battement [Chilvers and O'Callaghan, 2000], τ_w^* donne une estimation de la force par unité de surface permettant un déplacement constant (par rapport au temps) que pourrait exercer l'épithélium cilié sur le fluide, c.a.d., en extrapolant aux conditions *in vivo* sur la couche de mucus. Ce paramètre apparait comme un index global de l'efficacité potentiel du battement ciliaire. Il prend en compte les effets du battement ciliaire d'une bordure ciliée dans son ensemble (en intégrant en particulier la longueur d'onde de l'onde métachrone et la densité relative de cils) plutôt que de se focaliser sur un cil individuel. Si les conditions expérimentales (c.a.d., le milieu de survie cellulaire à la température de la pièce) sont constantes, alors τ_w^* permet de comparer l'efficacité du battement ciliaire de différents patients entre eux. Par ailleurs, cet index, qui peut être facilement obtenu par une simple régression parabolique sur les valeurs obtenues par suivi de microbilles, ne nécessite pas une intervention subjective d'un opérateur, ni une modification du protocole actuel de prélèvements d'échantillons chez les patients. Il ne nécessite en effet qu'un

brossage nasal (ou bronchique) qui fait partie de l'arsenal classique des examens prescrits dans le cadre de la prise en charge des ciliopathies.

Les basses valeurs de τ_w^* qui correspondent à une faible efficacité du battement ciliaire peuvent être expliquées par plusieurs causes distinctes : une altération des paramètres du battement ciliaire (FBC, ABC, LOOM), une diminution de la densité de cils, mais aussi par une désorganisation de la coordination des cils. Le modèle suppose, via l'onde métachrone, une parfaite coordination des cils.
Par conséquent, pour des hautes valeurs de τ_w^*, on s'attend à ce que les cils soient parfaitement coordonnés sans dégradation des paramètres du battement ciliaire (FBC, ABC, LOOM). En corollaire, la légère surestimation de la vitesse des microbilles (≈ 10 µm/s^{-1} en moyenne) induite par le modèle, que l'on peut voir sur le graphique de Bland et Altman (Fig. 8.4(b)), et qui semble être amplifiée pour les hautes vitesses laisse suggérer qu'une parfaite coordination n'est jamais totalement atteinte.
Au contraire, pour les basses valeurs de τ_w^*, une analyse du battement ciliaire complète (incluant l'ensemble des paramètres de [Papon et al., 2012]) peut être nécessaire pour trouver la ou les raisons (paramètres du battement ciliaire, désorganisation,...) de l'efficacité dégradée.
Pour le moment, il est difficile d'identifier le seuil exact de τ_w^* qui permettraient de discriminer les bordures cliniquement saines des bordures pathologiques. Cela nécessitera une étude clinique avec mesures de suivi de microbilles sur une cohorte de patients afin de comparer les patients avec des phénotypes de battement ciliaire bien définis. Mais il ne s'agissait pas de l'objectif de cette thèse.

τ_w^* montre une relativement grande hétérogénéité intra-patient (voir tableau 9.1). Cette hétérogénéité n'est pas totalement surprenante dans la mesure où ce type d'hétérogénéité a déjà été décrite par [Papon et al., 2012] pour les paramètres de l'analyse du battement ciliaire, y compris celui qui permet de discriminer les patients DCP et non-DCP avec une spécificité et une sensibilité de 0,97. Par conséquent, afin d'utiliser τ_w^* comme index clinique de l'efficacité du battement ciliaire, il faudra analyser et moyenner plusieurs bordures ciliées par patient.

τ_w^* correspond à une contrainte de cisaillement, soit à une force par unité de surface (pN/µm^2). Si on assume une densité de cils par unité de surface ρ_s à 5 cils/µm^2 [Hill et al., 2010], on trouve une force par cil F_c de :

$$F_c = \frac{\tau_w^*}{\rho_s} \tag{9.16}$$

F_c est donc égale, à partir des valeurs présentées dans le tableau 9.1, à $(1,14 \times 10^{-3}) \pm (1,23 \times 10^{-3})$ pN. Cette valeurs est bien plus faible (au moins 3 ordres de grandeur) que la valeur mesurée par AFM (§5.8.3) ou bien de celle mesurée par [Hill et al., 2010] sur des cultures des cellules épithéliales bronchiques humaines. Une telle différence est à priori difficile à expliquer. Néanmoins on peut remarquer que τ_w^* est la contrainte correspondant à la contribution constante de l'écoulement et donc que la force estimée à partir de τ_w^* l'est aussi alors que la force mesurée

par AFM est la contribution oscillante (à la fréquence du battement). Ces deux forces n'ont donc pas de raison d'être comparable. En revanche, si l'on compare la contrainte de cisaillement de notre modèle avec celle d'un écoulement assez proche au moins en terme de débit mis en jeu, on retrouve des valeurs beaucoup plus proches.

En effet si l'on considère l'expérience de Couette classique [Comolet, 1976] où deux cylindres circulaires coaxiaux, de rayons peu différents, sont séparés d'un espace intermédiaire e rempli de fluide (Fig. 9.2). Le cylindre extérieur tourne à vitesse constante V alors que l'autre cylindre est immobile. La contrainte de cisaillement totale exercée par les parois sur le fluide est donnée par :

$$\tau_v = \frac{2\mu}{e}V \qquad \text{pour un débit } Q_v = \frac{Ve}{2}dz \tag{9.17}$$

où μ est la viscosité dynamique du fluide et dz l'unité de longueur dans la direction z. Dans notre modèle, où le fluide a une vitesse à la paroi U_w^* et une hauteur h, la contrainte de cisaillement totale exercée par la paroi sur le fluide est donné par :

$$\tau_w^* = \frac{4\mu}{h}U_w^* \qquad \text{pour un débit } Q_w^* = \int_0^h u^*(y^*)dydz \simeq \frac{U_w^* h}{3}dz \tag{9.18}$$

On s'aperçoit (en assimilant U_w^* à V et h à e) que ces deux contraintes sont dans le même ordre de grandeur. La contrainte de cisaillement de notre modèle est plus élevée, mais dans le cas de l'expérience de Couette, le profil de vitesse est linéaire alors que dans notre cas, le profil de vitesse est parabolique avec une variation plus rapide de la vitesse à proximité de la paroi.
Ce résultat qui confirme notre estimation de la contrainte exercée par le battement ciliaire suggère aussi que la mesure de force par AFM au moins en l'état actuel (mesure de la force à la fréquence du battement) n'est pas forcément très pertinente pour la problématique de l'épuration mucociliaire.

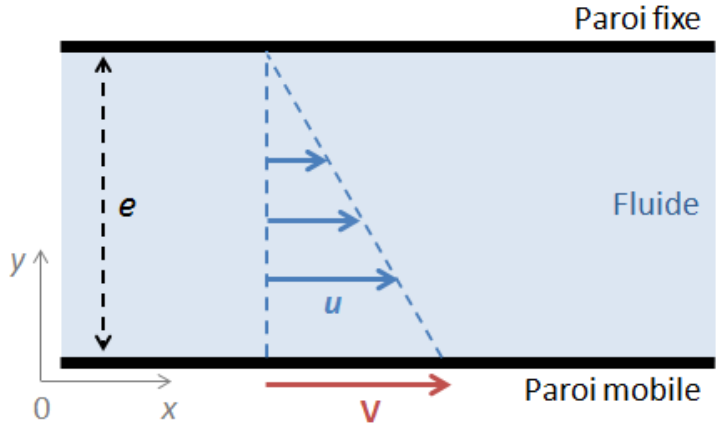


FIGURE 9.2 – **Schéma de l'expérience de Couette**. Modifié à partir du schéma original de [Comolet, 1976].

10 | Conclusion

L'objectif de cette présente thèse était de mieux caractériser, à partir des outils de la Biomécanique, les mécanismes du battement ciliaire dans le cadre du transport mucociliaire normal et pathologique et à transférer ces connaissances au profit de la clinique.

A partir de brossages nasaux filmés par vidéo-microscopie à haute vitesse, j'ai pu développer une caractérisation expérimentale des paramètres décrivant le battement ciliaire (fréquence de battement ciliaire, amplitude du battement ciliaire et trajectoire de la pointe d'un cil), la coordination des cils (longueur d'onde de l'onde métachrone et densité relative de cils) et l'efficacité du battement (méthode de suivi de microbilles).

J'ai ensuite proposé un modèle numérique permettant de simuler l'écoulement de fluide généré par le battement ciliaire dans le cadre de nos expériences de brossages. L'originalité de ce modèle est double, tout d'abord nous modélisons ici une couche de fluide infinie au dessus des cils où la vitesse s'annule passée une certaine hauteur, ensuite, nous avons inséré un paramètre qui rend compte du transfert imparfait de quantité de mouvement entre la bordure ciliée et le fluide. Le bon accord observé entre le modèle numérique et les résultats de suivi de microbilles (voir Fig. 8.4(a) et Fig. 8.4(b)) a permis de valider la pertinence du modèle numérique.

Ce modèle, dont le but était de simuler les expériences de suivi de microbilles, reste néanmoins une simplification de la réalité *in situ* et pourrait être dans l'avenir complété. Ainsi les paramètres du battement ciliaire (fréquence, amplitude,...) dépendent au moins en partie des caractéristiques du fluide dans lequel sont immergées les cellules ciliées. Dans les expériences de suivi de microbilles, que l'on veut faire reproduire par le modèle, les cils battent dans un fluide dont les caractéristiques thermodynamiques sont très proches de celles de l'eau à température ambiante. Cette condition est très éloignée des conditions réelles des voies aériennes recouvertes de mucus. En effet, si les cils battent dans une couche de liquide périciliaire, décrit comme "aqueux" et de faible viscosité, ils sont recouvert d'une couche de mucus qui est un gel avec des propriétés à la fois d'un solide élastique et d'un fluide visqueux non-Newtonien [Fahy and Dickey, 2010, Kesimer et al., 2013]. Des modèles prenant en compte les caractéristiques thermodynamiques du mucus (fluide Newtonien généralisé,...) peuvent être trouvés dans la littérature [Velez-Cordero and Lauga, 2013] et pourrait être associés au travail réalisé ici.
Le modèle suppose aussi implicitement que la bordure ciliée est infiniment longue. Il est clair l'utilisation de cette hypothèse aux condition de nos expériences où nos amas ont grossièrement

une longueur comprise entre 0.5 et 1 mm représente une simplification.

La confrontation entre l'expérience et la modélisation m'a permis de proposer, comme index de l'efficacité du battement ciliaire, la contribution constante de la contrainte de cisaillement exercée par le mur cilié sur le fluide. Cet index pourrait être facilement transféré dans les services cliniques. En effet cet index ne nécessite pas une modification du protocole actuel de prélèvements d'échantillons chez les patients. Il présente aussi l'avantage de ne comporter aucune phase d'évaluation subjective par un opérateur à la différence de ce qui se fait actuellement en routine pour la description du mouvement ciliaire. Cet index tout comme le modèle numérique dans son état actuel et le suivi de bille ne sont adaptés pour évaluer que des pathologies où le défaut de l'épuration mucociliaire provient d'une anomalie du battement ciliaire (ciliopathies). Ainsi, ils ne permettent pas d'évaluer des maladies comme la mucoviscidose où les défauts de l'épuration mucociliare proviennent d'une altération du mucus. Toutefois une première application de l'index de l'efficacité du battement ciliaire simulé à partir des paramètres du battement ciliaire de patients atteints de dyskinésies ciliaires primitives permet de montrer une diminution drastique de l'index chez ces patients. On retrouve également des observations connues des cliniciens ce qui aurait tendance à prouver l'intérêt clinique de cette index. Une étude clinique devra néanmoins être menée afin de déterminer le seuil permettant de discriminer pour les différente pathologies (innés ou acquises) le sain du pathologique. Le suivi de bille sera utilisée dans une première étude de recherche clinique (étude I-IsBaCc : Impact des Infections chroniques des voies aériennes Sur le Battement Ciliaire articulée autour d'un projet "d'évaluation biomécanique de l'épithélium respiratoire exposé à l'agression bactérienne", soutenue par la FRM (Programme Bio-ingénierie pour la santé 2014, sous la responsabilité de Daniel Isabey)) qui a débutée en septembre 2016.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de 4 communications (dont une récompensée par un prix) et de 5 posters (dont un récompensé par un prix) dans des conférences multidisciplinaires nationales et internationales (voir §A.1 & A.2). Deux articles jumelés sur la comparaison entre mesures expérimentales et numériques et sur le modèle numérique sont également en cours d'écriture.

Table des figures

2.1 Schéma des voies aériennes 8
2.2 Schéma de l'épithélium respiratoire 9
2.3 Caractéristiques du battement ciliaire 10
2.4 Ultrastructure du cil mobile 11
2.5 Figure récapitulative de la force exercée par les cils (ou flagelles) 15

3.1 Principe du brossage nasal 17
3.2 Schéma de la culture en interface air-liquide 19

4.1 Photo du banc de vidéo-microscopie à haute vitesse 23
4.2 Mesure de la taille d'un pixel grâce à l'utilisation d'une cellule de Malassez . . . 24
4.3 Photo du dépôt de cellules sur la lame du microscope 24
4.4 Principe de la mesure de fréquence par vidéo-kymographie 26
4.5 Analyse du niveau de gris par transformée de Fourier 26
4.6 Principe de l'analyse cinématique du battement ciliaire 27
4.7 Principe de la mesure de la longueur de l'onde métachrone 29
4.8 Principe de la densité relative de cils 29
4.9 Principe du suivi de la trajectoire de l'extrémité du cil 31
4.10 Exemple du traitement d'images pour le suivi de microbilles 33
4.11 Principe de la connexité 33
4.12 Exemple de trajectoires de microbilles sur une bordure 34
4.13 Schéma du calcul de la distance entre la microbille et la bordure ciliée 35
4.14 Schéma de l'installation de l'AFM 36
4.15 Schéma du protocole de spectroscopie de force en AFM au contact des cils . . . 38

5.1 Schéma de la sélection des brossages nasaux inclus 40
5.2 Effet de l'ajout de microbilles sur la fréquence de battement ciliaire 41
5.3 Simulation de la densité relative de cils 43
5.4 Vitesse des microbilles en fonction de la distance microbille-cils 44
5.5 Vitesse des microbilles en fonction de la distance 46
5.6 Comparaison entre la distance microbille-cils et les paramètres du battement ciliaire 46
5.7 Comparaison de la vitesse des microbilles en fonction de la fréquence de battement ciliaire 47

5.8 Comparaison entre la fréquence de battement ciliaire et les autres paramètres du battement ciliaire . . . 47
5.9 Comparaison de la vitesse des microbilles en fonction de l'amplitude de battement ciliaire . . . 48
5.10 Comparaison entre l'amplitude de battement ciliaire et les autres paramètres du battement ciliaire . . . 48
5.11 Comparaison de la vitesse des microbilles en fonction de la densité relative de cils 49
5.12 Comparaison entre la densité relative de cils et les autres paramètres du battement ciliaire . . . 49
5.13 Comparaison de la vitesse des microbilles en fonction de la longueur d'onde de l'onde métachrone . . . 50
5.14 Comparaison entre la longueur d'onde de l'onde métachrone et les autres paramètres du battement ciliaire . . . 50
5.15 Evolution des coordonnées sans dimension de l'extrémité d'un cil au cours d'une période de battement . . . 53
5.16 Modélisation de la trajectoire du cil durant un cycle de battement . . . 54
5.17 Variations de la hauteur de la pointe du cil dans le littérature . . . 54
5.18 Exemple de culture de CENH peu différenciée . . . 56
5.19 Exemple de marquages de la différenciation des cultures primaires de CENH en fonction du milieu utilisé . . . 57
5.20 Approche du cantilever sur une culture de CENH . . . 58
5.21 Exemple de signaux de déflexion du cantilever en fonction du temps . . . 58
5.22 Exemple du spectre fréquentiel de signaux de déflexion du cantilever en fonction du temps . . . 59
5.23 Fréquence fondamentale et force correspondante extraite des signaux d'AFM en fonction de l'altitude z du cantilever . . . 59
5.24 Schéma de la force exercée par les cils sur le cantilever . . . 60

6.1 Représentation de l'enveloppe recouvrant la couche de cils et de la propagation de l'onde métachrone . . . 61
6.2 Représentation schématique du mouvement elliptique de la pointe d'un cil . . . 62
6.3 Schéma du canal dans lequel est calculé le champ de vitesses . . . 65

7.1 Premier ordre champ de vitesses horizontal du fluide . . . 77
7.2 Premier ordre du champ de vitesses vertical du fluide . . . 77
7.3 Second ordre du champ de vitesses du fluide . . . 78
7.4 Champ de vitesses horizontal du fluide . . . 79
7.5 Champ de vitesses vertical du fluide . . . 79
7.6 Trajectoires des particules à plusieurs altitudes d'insertion dans le courant généré par les cils . . . 80
7.7 Vitesse des microbilles en fonction de la distance entre les microbilles et la paroi ciliée . . . 80

7.8 Contribution des différents ordres de la vitesse du fluide à la vitesse des microbilles U_{eff} 81
7.9 Modélisation elliptique de la trajectoire du cil durant un cycle de battement . . 85
7.10 Effet de la variation de β sur la vitesse du mur cilié 86

8.1 Courbe générale de la vitesse des microbilles en fonction de la distance microbille-cils 88
8.2 Enveloppe présentant une frontière solide sans glissement avec distribution de zones de glissements 88
8.3 Relation entre la longueur de glissement et la densité relative de cils 89
8.4 Comparaison entre la vitesse U_{exp} des microbilles mesurée par suivi de microbilles et la vitesse U_{num} prédite par le modèle numérique 90

9.1 Schéma du volume de fluide mis en mouvement par le battement ciliaire 93
9.2 Schéma de l'expérience de Couette 99

Liste des tableaux

5.1 Synthèse de la régression multiple pas à pas entre la variable vitesse des microbilles et les paramètres du battement ciliaire 51
5.2 Synthèse de la régression multiple entre la variable vitesse des microbilles et les paramètres du battement ciliaire 51

7.1 Impact de la variation d'un paramètre sur la vitesse des microbilles à la paroi ciliée U_0^* 83

9.1 Valeur des paramètres du battement ciliaire ainsi que de la vitesse des microbilles à la paroi et de l'index d'efficacité pour chaque des bordures ciliées 95
9.2 Paramètres mesurés du battement ciliaire et paramètres estimés par le modèle (vitesse à la paroi et index d'efficacité) pour les différents phénotypes de DCP . 97

Bibliographie

[Afzelius, 1976] Afzelius, B. A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science*, 193(4250) :317–9.

[Afzelius, 1985] Afzelius, B. A. (1985). The immotile-cilia syndrome : a microtubule-associated defect. *CRC Crit Rev Biochem*, 19 :63–87.

[Amirav et al., 2015] Amirav, I., Mussaffi, H., Roth, Y., Schmidts, M., Omran, H., and Werner, C. (2015). A reach-out system for video microscopy analysis of ciliary motions aiding pcd diagnosis. *BMC Research Notes*, 8 :71.

[Barbato et al., 2009] Barbato, A., Frischer, T., Kuehni, C., Snijders, D., I.Azevedo, Baktai, G., Bartoloni, L., Eber, E., Escribano, A., Haarman, E., Hesselmar, B., Hogg, C., Jorrissen, M., Lucas, J., Nielsen, K., O'Callaghan, C., Omran, H., Pohunek, P., Strippoli, M.-P. F., and Bush, A. (2009). Primary ciliary dyskinesia : a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J*, 34 :1264–1276.

[Beavers and Joseph, 1967] Beavers, G. S. and Joseph, D. D. (1967). Boundary conditions at a naturally permeable wall. *J Fluid Mech*, 30(1) :197–207.

[Binnig et al., 1986] Binnig, G., Quate, C. F., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56(9) :930–933.

[Blake, 1972] Blake, J. (1972). A model for the micro-structure in ciliated organisms. *J Fluid Mech*, 55.

[Blake and Winet, 1980] Blake, J. R. and Winet, H. (1980). On the mechanics of muco-ciliary transport. *Biorheology*, 17 :125–34.

[Blanchon et al., 2016] Blanchon, S., Legendre, M., Bottier, M., Tamalet, A., Montantin, G., Collot, N., Tissier, S., Faucon, C., Dastot, F., Copin, B., Clément, A., Filoche, M., Coste, A., Amselem, S., Escudier, E., Papon, J.-F., and Louis, B. (2016). Quantitative beating parameters predict the ciliary ultrastructure in primary ciliary dyskinesia. *Soumis*.

[Braat et al., 1995] Braat, J., Ainge, G., Bowles, J., Richards, D., Van-Riessen, D., Visser, W., and Rijntjes, E. (1995). 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. *Clin Exp Allergy*, 25(10) :957–65.

[Braiman and Priel, 2008] Braiman, A. and Priel, Z. (2008). Efficient mucociliary transport relies on efficient regulation of ciliary beating. *Respir Physiol Neurobiol*, 163 :202–207.

[Brumley et al., 2015] Brumley, D., Pollin, M., Pedley, T., and Goldstein, R. (2015). Metachronal waves in the flagellar beating of volvox and their hydrodynamic origin. *J R Soc Interface*, 12(108) :20141358.

[Bush et al., 2007] Bush, A., Chodhari, R., Collins, N., Copeland, F., Hall, P., Harcourt, J., Hariri, M., Hogg, C., Lucas, J., Mitchison, H. M., O'Callaghan, C., and Phillips, G. (2007). Primary ciliary dyskinesia : current state of the art. *Arch Dis Child*, 92(12) :1136–1140.

[Butt and Jaschke, 1995] Butt, H.-J. and Jaschke, M. (1995). Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6 :1–7.

[Canciani et al., 1988] Canciani, M., Barlocco, E. G., Mastella, G., De-Santi, M. M., Gardi, C., and Lungarella, G. (1988). The saccharin method for testing mucociliary function in patients suspected of having primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol*, 5(4) :210–4.

[Childress, 1981] Childress, S. (1981). *Mechanics of Swimming and Flying*. Cambridge University Press. Cambridge Books.

[Chilvers et al., 2001] Chilvers, M. A., Mckean, M., Rutman, A., Myint, B., Silverman, M., and O'Callaghan, C. (2001). The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J*, 18(6) :965–70.

[Chilvers and O'Callaghan, 2000] Chilvers, M. A. and O'Callaghan, C. (2000). Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging : comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax*, 55 :314–317.

[Comolet, 1976] Comolet, R. (1976). *Mecanique experimentale des fluide, Tome II : Dynamique des fluides reels, turbomachines*. Masson.

[Dasgupta et al., 2013] Dasgupta, M., Liu, B., Fu, H. C., Berhanu, M., Breuer, K. S., Powers, T. R., and Kudrolli, A. (2013). Speed of a swimming sheet in newtonian and viscoelastic fluids. *Phys Rev E*, 87 :013015.

[Davis and Lazarowski, 2008] Davis, C. W. and Lazarowski, E. (2008). Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. *Respir Physiol Neurobiol*, 163(1–3) :208–213. Respiratory Biomechanics.

[De Boeck et al., 2005] De Boeck, K., Proesmans, M., Mortelmans, L., Van Billoen, B., Willems, T., and Jorissen, M. (2005). Mucociliary transport using ^{99m}Tc-albumin colloid : a reliable screening test for primary ciliary dyskinesia. *Thorax*, 60 :414–417.

[Del Donno et al., 1988] Del Donno, M., Pavia, D., Agnew, J. E., Lopez-Vidriero, M. T., and Clarke, S. W. (1988). Variability and reproducibility in the measurement of tracheobronchial clearance in healthy subjects and patients with different obstructive lung diseases. *Eur Respir J*, 1(7) :613–20.

[Dresdner and Wong, 1984] Dresdner, R. D. and Wong, L. B. (1984). Measurement of ciliary beat frequency using high-speed video microscopy. *Biomed Sci Instrum*, 20 :37–46.

[Ellermand and Bisgaard, 1997] Ellermand, A. and Bisgaard, H. (1997). Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*, 10(10) :2376–9.

[Escudier et al., 1984] Escudier, E., Bernaudin, J., Bernaudin, P., Reinert, P., Canet, J., Boucherat, M., and R., P. (1984). Stroboscopic study of the respiratory mucosal ciliary beat frequency (Article in French). *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 101(2) :150–2.

[Escudier et al., 1998] Escudier, E., Brugel, L., Papon, J., and et al (1998). Human nasal epithelial cells cultured at air-liquid interface develop respiratory differenciation (abstract). *Allergologie*, 21 :560.

[Escudier et al., 2006] Escudier, E., Tamalet, A., Pruliere-Escabasse, V., Roger, G., and Coste, A. (2006). Dyskinésie ciliaire primitive. *Rev Fr Allergol*, 46 :530–537.

[Fahy and Dickey, 2010] Fahy, J. V. and Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med*, 363(23) :2233–47.

[Fliegauf et al., 2007] Fliegauf, M., benzing, T., and Omran, H. (2007). When cilia go bad : cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11) :880–93.

[Fu et al., 2009] Fu, H., Wolgemuth, W., and Powers, T. R. (2009). Swimming speeds of filaments in nonlinearly viscoelastic fluids. *Phys Fluids*, 21.

[Fulcher et al., 2005] Fulcher, M., Gabriel, S., Burns, K. A., Yankaskas, J. R., and Randell, S. H. (2005). Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods Mol Med*, 107 :183–206.

[Fulford and Blake, 1986] Fulford, G. R. and Blake, J. R. (1986). Muco-ciliary transport in the lung. *J Theor Biol*, 121 :381–402.

[Gautier et al., 2015] Gautier, H. O., Thompson, A. J., Achouri, S., Koser, D. E., Holtzmann, K., Moeendarbary, E., and Franze, K. (2015). Atomic force microscopybased force measurements on animal atomic force microscopybased atomic force microscopy-based force measurements on animal cells and tissues. *Methods Cells Biol*, 125 :211–235.

[Gheber and Priel, 1994] Gheber, L. and Priel, Z. (1994). Metachronal activity of cultured mucociliary epithelium under normal and stimulated conditions. *Cell Motil Cytoskeleton*, 28(4) :333–45.

[Gheber and Priel, 1997] Gheber, L. and Priel, Z. (1997). Extraction of cilium beat parameters by the combined application of photoelectric measurements and computer simulation. *Biophys J*, 72 :449–462.

[Gray, 1930] Gray, J. (1930). The mechanism of ciliary movement.–VI. photographic and stroboscopic analysis of ciliary movement. *Proc R Soc B*, 107(751) :313–332.

[Green et al., 1995] Green, A., Smallman, L. A., Logan, A. C. M., and Drake-Lee, A. (1995). The effect of temperature on nasal ciliary beat frequency. *Clin Otolaryngol*, 20 :178–180.

[Gruenert et al., 1995] Gruenert, D. C., Finkbeiner, W. E., and Widdicombe, J. H. (1995). Culture and transformation of human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 268(3) :L347–L360.

[Hill et al., 2010] Hill, D. B., Swaminathan, V., Estes, A., Cribb, J., O'Brien, E. T., Davis, C. W., and Superfine, R. (2010). Force generation and dynamics of individual cilia under external loading. *Biophys J*, 98 :57–66.

[Jackson et al., 2016] Jackson, C. L., Behan, L., Collins, S. A., Goggin, P. M., Adam, E. C., Coles, J. L., Evans, H. J., Harris, A., Lackie, P., Packham, S., Page, A., Thompson, J., Walker, W. T., Kuehni, C., and Lucas, J. S. (2016). Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*, 47(3) :837–848.

[Kartagener, 1933] Kartagener, M. (1933). Zur pathogenese der bronchiektasien : Bronchiektasien bei situs. *Beitrage zur Klinik der Tuberkulose*, pages 489–501.

[Keller, 1975] Keller, S. R. (1975). *Fluid mechanical investigations of ciliary propulsion.* PhD thesis, California Institute of Technology.

[Kesimer et al., 2013] Kesimer, M., Ehre, C., Burns, K., Davis, C., Sheehan, J., and Pickles, R. (2013). Molecular organization of the mucins and glycocalyx underlying mucus transport over mucosal surfaces of the airways. *Mucosal Immunol*, 6 :379–92.

[Knowles et al., 2013] Knowles, M., Daniels, L., Davis, S., Zariwala, M., and Leigh, M. (2013). Primary ciliary dyskinesia. recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 188(8) :913–22.

[Knowles and Boucher, 2002] Knowles, M. R. and Boucher, R. C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest*, 109 :571–577.

[König et al., 1996] König, K., Svaasand, L., Liu, Y., Sonek, G., Patrizio, P., Tadir, Y., Berns, M., and Tromberg, B. (1996). Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap. *Cell Mol Biol*, 42(4) :501–509.

[Lauga, 2007] Lauga, E. (2007). Propulsion in a viscoelastic fluid. *Phys Fluids*, 19.

[Lauga and Powers, 2009] Lauga, E. and Powers, T. R. (2009). The hydrodynamics of swimming microorganisms. *Rep Prog Phys*, 72(9) :096601.

[Lee et al., 2011] Lee, W., Jayathilake, P., Tan, Z., Le, D., Lee, H., and Khoo, B. (2011). Mucociliary transport : Effect of mucus viscosity, cilia beat frequency and cilia density. *Comput Fluid*, 49(1) :214–221.

[Leopold et al., 2009] Leopold, P., O'Mahony, M., Lian, X. J., Tilley, A., Harvey, B., and Crystal, R. (2009). Smoking is associated with shortened airway cilia. *Plos One*, 4(12) : e8157.

[Liu et al., 2011] Liu, B., Powers, T. R., and Breuer, K. S. (2011). Force-free swimming of a model helical flagellum in viscoelastic fluids. *PNAS*, 108 :19516–19520.

[Liu et al., 2013] Liu, L., chu, K., Houser, G., Diephuis, B., Li, Y., Wilstreman, E., Shastry, S., Dierksen, G., Birket, S., Mazur, M., Byan-Parker, S., Grizzle, W. E., Sorscher, E. J., Rowe, S. M., and Tearney, G. J. (2013). Method for quantitative study of airway functional microanatomy using micro-optical coherence tomography. *Plos One*, 8(1) :e54473.

[Machemer, 1972] Machemer, H. (1972). Ciliary activity and the origin of metachrnoy in paramecium : effects of incresead viscosity. *J Exp Biol*, 57 :239–259.

[Martiniano et al., 2014] Martiniano, S. L., Hoppe, J. E., Sagel, S. D., and Zemanick, E. T. (2014). Advances in the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Adv Pediatr*, 61(1) :225–243. Advances in Pediatrics.

[Mitchison and Mitchison, 2010] Mitchison, T. and Mitchison, H. (2010). How cilia beat. *Nature*, 463 :308–309.

[Mitran, 2007] Mitran, S. M. (2007). Metachronal wave formation in a model of pulmonary cilia. *Comput Struct*, 85 :763–774.

[Morris et al., 1999] Morris, V. J., Kirby, A. R., Gunning, A. P., and World, S. (1999). *Atomic force microscopy for Atomic force microscopy for biologists*. London : Imperial College Press.

[Mortensen, 1998] Mortensen, J. (1998). Bronchoscintigraphy and pulmonary clearance of 99mtc-albumin colloid in the study of mucociliary clearance. *Dan Med Bull*, 45(2) :195–209.

[Müller and Dufrene, 2008] Müller, D. J. and Dufrene, Y. F. (2008). Atomic force microscopy as a multifunctional molecular atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology. *Nature Nanotech*, 3(5) :261–269.

[Munkholm et al., 2015] Munkholm, M., Nielsen, K. G., and Mortensen, J. (2015). Clinical value of measurement of pulmonary radioaerosol mucociliary clearance in the work up of primary ciliary dyskinesia. *EJNMMI Res*, 5 :39.

[Okamoto and Nakaka, 1994] Okamoto, K. and Nakaka, Y. (1994). Reconstitution of metachronal waves in ciliated cortical sheets of paramecium. *J Exp Biol*, 192 :73–81.

[Papon et al., 2002] Papon, J., Coste, A., Gendron, M., Cordonnier, C., Wingerstmann, L., Peynegre, R., and Escudier, E. (2002). HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *Laryngoscope*, 112(11) :2067–75.

[Papon et al., 2010] Papon, J., Coste, A., Roudot-Thoraval, F., Boucherat, M., Roger, G., Tamalet, A., Vojtek, A., Amselem, S., and Escudier, E. (2010). A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*, 35 :1057–1063.

[Papon et al., 2012] Papon, J. F., Bassinet, L., Cariou-Patron, G., Zerah-Lancner, F., Vojtek, A.-M., Blanchon, S., Crestani, B., Amselem, S., Coste, A., Housset, B., Escudier, E., and Louis, B. (2012). Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia : a pilot study. *Orphanet J Rare Dis*, 7 :78.

[Passàli et al., 1984] Passàli, D., Bellussi, L., and Seta, E. D. (1984). Experiences in the determination of nasal mucociliary transport time. *Acta Otolaryngol*, 97(3-4) :319–323.

[Quinn et al., 2015] Quinn, S. P., Zahid, M. J., Durkin, J. R., Francis, R. J., Lo, C. X., and Chennubhotla, S. C. (2015). Automated identification of abnormal respiratory ciliary motion in nasal biopsies. *Sci Transl Med*, 7(299) :299ra124.

[Ross and Corrsin, 1974] Ross, S. M. and Corrsin, S. (1974). Results of an analytical model of mucociliary pumping. *J Appl Physiol*, 34(3) :333–40.

[Rutland and Cole, 1980] Rutland, J. and Cole, P. J. (1980). Originally published as Volume 2, Issue 8194 : Non-invasive sampling of nasal cilia for measurement of beat frequency and study of ultrastructure. *Lancet*, 316(8194) :564–565.

[Sakakibara et al., 2004] Sakakibara, H. M., Kunioka, Y., Yamada, T., and Kamimura, S. (2004). Diameter oscillation of axonemes in sea-urchin sperm flagella. *Biophysical Journal*, 86(1) :346 – 352.

[Salathe, 2007] Salathe, M. (2007). Regulation of mammalian ciliary beating. *Annu Rev Physiol*, 69 :401–22.

[Sanderson and Sleigh, 1981] Sanderson, M. J. and Sleigh, M. A. (1981). Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium : beat pattern and metachrony. *J Cell Sci*, 47 :331–47.

[Satir and Christensen, 2007] Satir, P. and Christensen, S. T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol*, 69 :14.1–14.24.

[Sbragaglia and Prosperetti, 2007] Sbragaglia, M. and Prosperetti, A. (2007). Effective velocity boundary condition at a mixed slip surface. *J Fluid Mech*, 578 :435–451.

[Schipper et al., 1991] Schipper, N. G. M., Verhoef, J. C., and Merkus, F. W. H. M. (1991). The nasal mucociliary clearance : Relevance to nasal drug delivery. *Pharm Res*, 8(7) :807–814.

[Schmitz et al., 2000] Schmitz, K. A., Holcomb-Wygle, D. L., Oberski, D. J., and Lindemann, C. B. (2000). Measurement of the force produced by an intact bull sperm flagellum in isometric arrest and estimation of the dynein stall force. *Biophys J*, 79 :468–478.

[Sears et al., 2015] Sears, P. R., Yin, W. N., and Ostrowski, L. E. (2015). Continuous mucociliary transport by primary human airway epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 309(2).

[Shen and Arratia, 2011] Shen, X. N. and Arratia, P. E. (2011). Undulatory swimming in viscoelastic fluids. *Phys Rev Lett*, 106 :208101.

[Sleigh et al., 1988] Sleigh, M. A., Blake, J. R., and Liron, N. (1988). The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis*, 137(13) :726–41.

[Smith et al., 2007] Smith, D. J., Gaffney, E. A., and Blake, J. R. (2007). Discrete cilia modelling with singularity distributions : Application to the embryonic node and the airway surface liquid. *Bull Math Biol*, 69(5) :1477–1510.

[Smith et al., 2008] Smith, D. J., Gaffney, E. A., and Blake, J. R. (2008). Modelling mucociliary clearance. *Resp Physiol Neurobi*, 163 :178–188.

[Stannard et al., 2010] Stannard, W. A., Chilvers, M. A., Rutman, A. R., Williams, C. D., and O'Callaghan, C. (2010). Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med*, 181(4) :307–314.

[Tani and Kamimura, 1999] Tani, T. and Kamimura, S. (1999). Dynein-adp as a force-generating intermediate revealed by a rapid reactivation of flagellar axoneme. *Biophys J*, 77(3) :1518–1527.

[Teff et al., 2007] Teff, Z., Priel, Z., and Gheber, L. A. (2007). Forces applied by cilia measured on explants from mucociliary tissue. *Biophys J*, 92 :1813–1823.

[Teran et al., 2010] Teran, J., Fauci, L., and Shelley, M. (2010). Viscoelastic fluid response can increase the speed and efficiency of a free swimmer. *Phys Rev Lett*, 104 :038101.

[Thomas et al., 2010] Thomas, B., Rutman, A., Hirst, R. A., Haldar, P., Wardlaw, A. J., Bankart, J., Brightling, C. E., , and O'Callaghan, C. (2010). Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 126(4) :722–729.e2.

[Thomas et al., 2009] Thomas, B., Rutman, A., and O'Callaghan, C. (2009). Disrupted ciliated epithelium shows slower ciliary beat frequency and increased dyskinesia. *Eur Respir J*, 34 :401–404.

[van de Donk et al., 1982] van de Donk, H., van den Heuvel, A., Zuidema, J., and Merkus, F. (1982). The effects of nasal drops and their additives on human nasal mucociliary clearance. *Rhinology*, 20 :127–37.

[Vasquez et al., 2016] Vasquez, P. A., Jin, Y., Palmer, E., Hill, D., and Forest, M. G. (2016). Modeling and simulation of mucus flow in human bronchial epithelial cell cultures - part I : Idealized axisymmetric swirling flow. *Plos Comp Biol*, 12(8) :e1004872.

[Velez-Cordero and Lauga, 2013] Velez-Cordero, J. R. and Lauga, E. (2013). Waving transport and propulsion in a generalized newtonian fluid. *J Non-Newton Fluid*, 199 :37–50.

[Verma and Tripathee, 2013] Verma, V. S. and Tripathee, S. M. (2013). A planar model for muco-ciliary transport in the human lung : effects of mucus visco-elasticity, cilia beating and porosity. *IJMMPS*, 1(1).

[Wanner et al., 1996] Wanner, A., Salathe, M., and O'Riordan, T. G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 154 :1868–1902.

[Widdicombe and Widdicombe, 1995] Widdicombe, J. H. and Widdicombe, J. G. (1995). Regulation of human airway surface liquid. *Respir Physiol*, 99 :3–12.

[Wolff, 1986] Wolff, R. K. (1986). Effects of airborne pollutants on mucociliary clearance. *Environ Health Perspect*, 66 :223–237.

[Yaghi et al., 2012] Yaghi, A., Zaman, A., Cox, G., and Dolovich, M. B. (2012). Ciliary beating is depressed in nasal cilia from chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Res Med*, 106 :1139–147.

[Yang and Dillon, 2008] Yang, X. and Dillon, Robert H.and Fauci, L. J. (2008). An integrative computational model of multiciliary beating. *Bull Math Biol*, 70(4) :1192–1215.

[Yeates et al., 1981] Yeates, D. B., Pitt, B. R., Spektor, D. M., Karron, G. A., and Albert, R. E. (1981). Coordination of mucociliary transport in human trachea and intrapulmonary airways. *J Appl Physiol*, 51(5) :1057–64.

[Yoneda, 1960] Yoneda, M. (1960). Force exerted by a single cilium of mytilus edulis I. *J Exp Biol*, 37(2) :461–469.

[Zhang et al., 2015] Zhang, X. P., Lund, N. J., and Hendy, S. C. (2015). Effective slip length : some analytical and numerical results. *ANZIAM J*, 57 :79–88.

[Zhu et al., 2012] Zhu, L., Lauga, E., and Brandt, L. (2012). Self-propulsion in viscoelastic fluids : Pushers vs. pullers. *Phys Fluids*, 24(5).

A | Annexes

A.1 Communications orales

A global index for characterizing ciliary beating efficiency in pulmonary airways
Bottier M, Blanchon S, Pelle G, Béquignon E, Isabey D, Coste A, Escudier E, Grotberg JB, Papon JF, Filoche M and Louis B
BMES Annual Meeting 2016, Minneapolis, MN, États Unis (octobre 2016)

Experimental and numerical analysis of microbead motion to characterize flow induced by ciliary beating
Bottier M, Peña Fernández M, Blanchon S, Pelle G, Béquignon E, Isabey D, Coste A, Escudier E, Grotberg JB, Papon JF, Louis B and Filoche M
22nd Congress of the European Society of Biomechanics, Lyon, France (juillet 2016)

Experimental and numerical analysis of microbead motion to characterize flow induced by ciliary beating : Application in PCD
Bottier M, Peña Fernández M, Blanchon S, Pelle G, Béquignon E, Isabey D, Coste A, Escudier E, Grotberg JB, Papon JF, Louis B and Filoche M
2nd Young researchers meeting and 1st Training school of BEAT-PCD, Paris, France (avril 2016)

Coupling ciliary beat pattern and induced flow analysis : a new approach to characterize PCD, *Prix honorifique pour l'excellence de la présentation*
Bottier M, Blanchon S, Filoche M, Isabey D, Coste A, Escudier E, Papon JF and Louis B
1st Young researchers meeting on PCD, Berne, Suisse (mars 2015)

A.2 Présentation de poster

Ex-vivo measurement and mathematical model of a flow induced by cilia motion : Application in Primary Ciliary Dyskinesia, *Prix Vertex du meilleur poster*
Bottier M, Peña Fernández M, Blanchon S, Pelle G, Béquignon E, Isabey D, Coste A, Escudier E, Grotberg JB, Papon JF, Louis B and Filoche M
The Inaugural conference of BEAT-PCD, Southampton, Angleterre (décembre 2015)

Experimental and numerical analysis of micro-beads velocity in a flow induced by cilia motion
Bottier M, Peña Fernández M, Pelle G, Béquignon E, Isabey D, Coste A, Escudier E, Manolidis M, Grotberg JB, Papon JF, Louis B and Filoche M
BMES 2015 Annual Meeting, Tampa, FL, États Unis (octobre 2015)

Analysis of upper airway ciliary beating efficiency : experimental and numerical approach
Bottier M
Doctoriales 2015, Chamarande, France (octobre 2015)

Analysis of cilium motion and its induced flow : a new approach for characterizing upper airway ciliary beat
Bottier M, Blanchon S, Filoche M, Isabey D, Coste A, Escudier E, Papon JF and Louis B
Journée de la science de la vie de Créteil 2015, Paris, France (mars 2015)

Characterization of upper airway ciliary beat by coupling isolated and collective cilia motion analysis
Bottier M, Blanchon S, Filoche M, Isabey D, Coste A, Escudier E, Papon JF and Louis B
CILIA 2014 Conference, Paris, France (novembre 2014)

Résumé

L'épuration mucociliaire est la première ligne de défense de l'appareil respiratoire. L'altération de l'épuration mucociliaire se traduit par une stagnation et/ou une accumulation de mucus, conduisant potentiellement à des obstructions plus ou moins partielles et à des infections chroniques des voies aériennes. On compte deux grands types d'altération de l'épuration mucociliaire. Le premier est lié aux caractéristiques du mucus, comme dans le cas de la mucoviscidose. Le deuxième est lié à des anomalies de l'ultrastructure du cil et /ou de son battement regroupées sous le terme de "ciliopathies"qui peuvent être soit innées soit acquises. Ce travail, qui s'inscrit dans le cadre clinique de la problématique des ciliopathies respiratoires et de leur prise en charge, a pour objectif de mieux caractériser, à partir des outils de la Biomécanique, les mécanismes du battement ciliaire (incluant une mesure de l'efficacité globale du battement des cils) et à transférer ces connaissances au profit de la clinique. Pour cela une méthodologie de caractérisation systématique de la mécanique ciliaire à partir de prélèvements biologiques issus de patients observés par vidéo-microscopie à haute vitesse a été développée parallèlement au développement d'un modèle numérique intégrant le couplage entre battement ciliaire et transport de fluide. Cette association entre expériences et modèle numérique a permis de proposer un nouvel index utilisable par les cliniciens pour caractériser l'efficacité du battement ciliaire. Cet index présente l'avantage de ne pas exiger de modification de la pratique clinique concernant la collecte de données biologiques.

Abstract

Mucociliary clearance is the first line of defense of the respiratory tract. Alteration of this clearance leads to a stagnation and/or accumulation of mucus, potentially resulting in more or less partially obstructions and in chronic infections of the airways. There are two main types of mucociliary clearance alterations. The first one is linked to the mucus characteristics, as in cystic fibrosis. The second one is connected to cilium ultrastructure abnormalities and/or ciliary beating defects encompassed by the term of "ciliopathies" which may be primary or acquired. This work, which takes place in the clinical issue of respiratory ciliopathies and their care, aims to better characterize, through biomechanics tools, the mechanisms of ciliary beating (including a measurement of the global efficiency of cilia) and to transfer these knowledges in favor of the clinical management. A methodology of systematic characterization of the ciliary mechanics, from biological samples derived from patients observed through high-speed video-microscopy analysis, has been developed as the same time as the development of a numerical model incorporating the coupling between ciliary beating and fluid motion. This association between experiments and numerical model allowed to propose a new index usable by the clinicians to characterize the ciliary beating efficiency. This index has the advantage of not requiring a modification of the clinical practice of biological data collection.