



HAL
open science

Approche biophysique de la fonction muco-ciliaire de l'épithélium bronchique : propriétés d'écoulement du mucus et coordination du battement ciliaire

Myriam Jory

► **To cite this version:**

Myriam Jory. Approche biophysique de la fonction muco-ciliaire de l'épithélium bronchique : propriétés d'écoulement du mucus et coordination du battement ciliaire. Autre [cond-mat.other]. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONT078 . tel-02485748

HAL Id: tel-02485748

<https://theses.hal.science/tel-02485748>

Submitted on 20 Feb 2020

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Physique

École doctorale Information Structures Systèmes (I2S)

Unité de recherche UMR 5221

Approche biophysique de la fonction muco-ciliaire de l'épithélium bronchique : propriétés d'écoulement du mucus et coordination du battement ciliaire

Présentée par Myriam JORY

Le 04 Décembre 2019

Sous la direction de Gladys MASSIERA et Arnaud BOURDIN

Rapporteurs

Pietro CICUTA, Professeur, University of Cambridge, Cavendish laboratory

Christian WAGNER, Professeur, Universität des Saarlandes, Experimentalphysik

Devant le jury composé de

Isabelle SERMET-GAUDELUS, Professeur, Université Paris Descartes, Institut Necker Enfants Malades

Christian WAGNER, Professeur, Universität des Saarlandes, Experimentalphysik

Andrea PARMEGGIANI, Professeur, Université de Montpellier, Laboratoire Charles Coulomb

Gladys MASSIERA, Professeur, Université de Montpellier, Laboratoire Charles Coulomb

Arnaud BOURDIN, Professeur, Hôpital Universitaire de Montpellier Arnaud de Villeneuve

Présidente du jury

Rapporteur

Invité

Directrice de thèse

Co-Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

RESUME

Comprendre et soigner les pathologies respiratoires chroniques constituent des enjeux médicaux croissants du fait des modifications de nos modes de vie et de notre environnement. L'épithélium des voies respiratoires assure le rôle de première barrière contre les agressions extérieures grâce à la fonction mucociliaire. Les deux éléments fonctionnels de la fonction mucociliaire sont la couche de mucus sécrétée par l'épithélium et le battement des cils des cellules ciliées qui contribue à la mise en mouvement de cette couche et à son évacuation des bronches. Le mucus est un fluide complexe et hétérogène et ses propriétés mécaniques couplées aux mécanismes de coordination des cils restent encore mal compris. Mes travaux de thèse ont porté sur une approche biophysique de ces mécanismes. Premièrement, l'étude de la rhéologie du mucus a été menée à deux échelles : en macro-rhéologie de cisaillement et par micro-rhéologie active grâce aux pincettes optiques. Les pincettes optiques permettent également des mesures in situ sur le tissu et des mesures d'adhésion. L'utilisation de la rhéologie comme marqueur des pathologies respiratoires chroniques a été explorée. Deuxièmement, la quantification et la compréhension de la coordination spatio-temporelle de l'activité ciliaire et du transport du mucus engendré ont été conduites, en développant un nouvel outil de traitement d'images de vidéo-microscopie et d'analyse de données.

Mots clés : Biophysique, Epithélium Bronchique, Mucus, Rhéologie, Cils actifs, Mouvements collectifs.

Biophysical approach of the mucociliary function of bronchial epithelium: mucus rheology and coordination of the ciliary beating

Understanding and treating chronic respiratory diseases are growing medical challenges due to changes in our lifestyles and environment. The epithelium of the respiratory tract is the first barrier against external aggression, in particular thanks to the mucociliary function. Functional elements are the mucus layer lining the tissue and the beating of cilia from the ciliated cells of the epithelium. Mucus is a complex and heterogeneous fluid that acts as a protective barrier by trapping particles and pathogens present in the inhaled air, while the coordination of the cilia beating allows the directed transport of the mucus layer and its evacuation from the bronchi. The mechanical properties of mucus coupled with the coordination mechanisms of beating cilia are still poorly understood. My thesis work focused on two biophysical aspects of these mechanisms: i) the study of mucus rheology at two scales, in macro-rheology and by active micro-rheology using optical tweezers directly on the tissue; ii) the understanding and quantification of the spatiotemporal coordination of ciliary activity and on the associated mucus transport, by developing a new tool for processing video-microscopy images and data analysis.

Key words: Biophysics, Human Bronchial Epithelium (HBE), Mucus, Rheology, Motile cilia, Collective motion.

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont témoigné au projet, et pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à mes rapporteurs Messieurs Pietro Cicuta et Christian Wagner pour leur lecture et rapports sur cette thèse en français.

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse Gladys Massiera pour la confiance qu'elle m'a témoigné en me confiant ce projet, la liberté quelle m'a donné dans mon travail et son management très humain. Je la remercie pour m'avoir poussé à améliorer des compétences que j'avais laissé quelque peu de côté, comme mon niveau d'anglais et de rédaction.

J'adresse également mes remerciements à mon co-directeur de thèse Arnaud Bourdin pour sa bienveillance, ses conseils et ses avis toujours enrichissants, les connaissances biomédicales qu'il m'a apportées, et la disponibilité qu'il m'a toujours accordée lorsqu'il le fallait malgré son emploi du temps très chargé.

A mes encadrantes Isabelle Vachier et Laura Casanellas pour leur bienveillance, leurs conseils et leur disponibilité. Merci en particulier à Laura pour ses conseils et critiques toujours directs et constructifs, tout en soulignant les points positifs.

Un grand merci à Christophe Blanc pour sa grande gentillesse et sa disponibilité, sa curiosité et son écoute, nos discussions scientifiques passionnantes, enrichissantes et constructives. J'ai énormément appris grâce à nos échanges.

Je tiens à remercier Andrea Parmeggiani pour la confiance qu'il m'a témoigné en tant qu'étudiante et la passion pour la biophysique qu'il a su me transmettre. Je le remercie pour m'avoir mise en contact avec Gladys Massiera et avoir soutenu et suivi mon projet en participant à mes comités de suivi de thèse et au jury de ma soutenance.

Je remercie toute l'équipe technique et administrative du laboratoire Charles Coulomb. Merci à Jean-Marc Fromental pour son aide sur l'utilisation des rhéomètres. A Laurent Nehlig pour son aide et sa disponibilité dès qu'un problème informatique survenait. A Rémi Jelinek pour avoir résolu mes problèmes d'électroniques sur les appareils. A Reymond Aznar pour son aide et ses conseils sur l'entretien de la salle de manipulation de biophysique. Merci à Ty Phou pour ses bons conseils et sa taquinerie bienveillante. Merci à Edouard Chauveau pour son aide sur l'appareil de thermogravimétrie et les commandes de matériels. A Jean-Christophe Art et Stéphanie Martegoutes pour leur aide administrative, les commandes et la réception des colis. A Adoration Gabillard pour sa grande gentillesse et son aide administrative au début du contrat doctoral. A Geneviève Carriere du Labex Numev pour sa gentillesse et son aide sur la préparation des missions pendant ma thèse.

Un grand merci à mes collègues biologistes et médecins à l'hôpital et à l'IRMB (Engi Ahmed, Joffrey Mianne, Chloé Bourguignon, Mathieu Fieldes) pour leurs conseils et informations sur les

cultures d'épithélia. A Paul Reynaud pour avoir réalisé des prélèvements de mucus in vivo pour mon projet et merci aux patients qui ont accepté ces prélèvements. A Aurélie Fort et Charlotte Vernisse pour leur disponibilité, les échantillons qu'elles m'ont fournis, les tests qu'elles ont réalisé à ma demande et leurs relectures sur les méthodes concernant les cultures. Merci en particulier à Charlotte pour son soutien.

Merci aux stagiaires Karim Bellouma, Youness Babaaziz et Romain Rescanieres, que j'ai eu la chance d'encadrer, pour leur aide sur mon projet et ce qu'ils m'ont apporté.

A mes collègues du L2C pour leurs encouragements et leurs conseils bienveillants et constructifs, et plus généralement pour la bonne ambiance de travail au sein de l'équipe. A Anthony pour sa bonne humeur communicative et ses conseils culinaires. A Fanny pour nos papotages et pour les bonnes ambiances et conditions de travail dans la salle de biophysique. A Alexandre pour nos longs débats et non randonnées revigorantes. Un merci particulier à Ameer pour ses conseils et avis, et sa taquinerie bienveillante ; à Carole-Ann pour sa bonne humeur et son empathie ; à Juliette pour ses conseils et son soutien.

A ma famille pour son soutien moral dans faille, ses encouragements et sa confiance en mon travail. A mon papa pour ses corrections et ses avis sur le manuscrit. Un merci particulier pour mon compagnon qui m'a soutenu et supporté au quotidien et qui m'a concocté de bons petits plats pour me redonner de l'énergie. Je ne pense pas que j'aurai eu la force d'aller jusqu'au bout sans toi.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	2
REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
INTRODUCTION GENERALE	7
EPITHELIUM BRONCHIQUE ET FONCTION MUCOCILIAIRE.....	9
1. Physiologie de l'épithélium bronchique	10
2. Enjeux fondamentaux et médicaux	13
3. Le modèle d'épithélium bronchique humain.....	18
3.1. La culture ALI (Air Liquid Interface) d'épithélium bronchique humain.....	18
3.2. Les cultures ALI étudiées au cours du projet	19
PARTIE I : PROPRIETES D'ECOULEMENT DU MUCUS.....	22
Plan détaillé de la première partie	23
I.1. Etat de l'Art sur le mucus	25
I.1.1. Composition du mucus.....	25
I.1.2. Propriétés des mucines et structure du réseau	27
I.1.3. Rhéologie du mucus	31
I.1.4. Propriétés adhésives du mucus.....	41
I.1.5. Conclusion : le mucus un fluide complexe	45
I.2. Méthodes expérimentales et prélèvements du mucus.....	47
I.2.1. Origines des échantillons de mucus	47
I.2.2. Rhéologie	50
I.2.3. Mesure de la composition biochimique du mucus	77
I.2.4. Images de la structure par microscopie électronique à balayage (cryo-SEM).....	79
I.3. Résultats sur la rhéologie du mucus.....	80
I.3.1. Article 1 : Comparaison des propriétés viscoélastiques du mucus à l'échelle macro- et microscopique	80
I.3.2. Article 2 : Evolution de la micro-viscoélasticité du mucus sur la culture en fonction de la distance au tissu et comparaison avec du mucus prélevé <i>in vivo</i>	121

I.4. Conclusions et Perspectives	143
PARTIE II : COORDINATION SPATIO-TEMPORELLE DU BATTEMENT CILIAIRE	143
Plan détaillé de la deuxième partie	144
II.1. Etat de l'Art	146
II.1.1. Biologie du battement ciliaire	146
II.1.2. Couplage hydrodynamique entre cils et fluides	151
II.1.3. Conclusion : complexité et modulation de la coordination ciliaire et du transport associé.....	173
II.2. Méthodes d'acquisition, de traitement et d'analyse des vidéos	175
II.2.1. Acquisition du battement ciliaire et du transport du fluide par vidéo-microscopie.....	175
II.2.2. Article 3 : Traitements des vidéos et analyses des trajectoires de battement	179
II.2.3. Calcul du champ de vitesse de transport.....	211
II.3. Caractérisation de l'activité ciliaire et du transport du mucus	213
II.3.1. Comparaison entre les cultures BEGM et PneumaCult et entre les trois groupes de patients	213
II.3.2. Quelques exemples sur l'effet de drogues spécifiques	215
II.3.3. Impact de la viscoélasticité du fluide.....	221
II.3.4. Evolution en fonction de la maturité de la culture	223
II.4. Coordination spatio-temporelle du battement ciliaire.....	231
II.4.1. Caractérisation du battement individuel des cils	231
II.4.2. Coordination intra cellules ciliées, types et évolution des mécanismes de battement	234
II.4.3. Coordination inter cellules ciliées.....	241
II.5. Conclusions et Perspectives	244
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES	247
ANNEXES.....	249
A.1. Protocole de traitement du verre au PolyEthylène-Glycol (PEG).....	249
BIBLIOGRAPHIE.....	251

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies chroniques respiratoires (asthme, broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), ...) affectent des centaines de millions de personnes dans le monde. La prise en charge de ces maladies chroniques en termes de traitement, d'hospitalisation et de pension d'invalidité représente un coût économique important pour les systèmes de santé publique. Par ailleurs, ces maladies affectent gravement la qualité de vie des patients, en particulier dans le de cas symptômes incontrôlés et d'obstruction permanente des bronches. Comprendre et soigner ces pathologies respiratoires chroniques constituent donc des enjeux médicaux majeurs et croissants du fait des modifications de nos modes de vie et de notre environnement.

L'épithélium des voies respiratoires est à l'interface entre notre environnement et notre système respiratoire et constitue donc la première barrière contre les particules, pathogènes et allergènes extérieurs présents dans l'air inhalé. Sa fonction protectrice repose notamment sur la fonction mucociliaire qui assure un nettoyage continu des bronches et dont les deux éléments fonctionnels sont la couche de mucus tapissant le tissu et le battement des cils des cellules ciliées de l'épithélium. Le mucus est un fluide complexe et hétérogène qui joue un rôle de barrière protectrice en piégeant les corps étrangers présents dans l'air inhalé tandis que la coordination du battement des cils sur l'épithélium permet le transport organisé de la couche de mucus et son évacuation des bronches. Les propriétés mécaniques du mucus couplées aux mécanismes de coordination des cils sont donc fondamentaux pour l'efficacité de la fonction mucociliaire et restent encore mal compris.

Ce projet de thèse porte sur une approche biophysique de l'étude de la fonction mucociliaire de l'épithélium bronchique humain. Il s'inscrit dans le long terme et la pluridisciplinarité, en collaboration avec des physiciens, des biologistes et des médecins (CHU Montpellier / MedBioMed). Il a pour but de comprendre les mécanismes de cette fonction complexe ainsi que sa réponse à divers stimuli extérieurs et de cibler les dysfonctions pour aider au diagnostic et au soin des patients atteints de pathologies respiratoires (en particulier la bronchopneumopathie chronique obstructive). Pour cela, le système que j'ai étudié au cours de ma thèse est un modèle d'épithélium bronchique humain, reconstitué par la culture de cellules prélevées lors d'examen médicaux. Ce modèle de culture est nommé ALI (Air-Liquid Interface) car la différenciation des cellules du tissu est conduite par la mise en interface à l'air des cellules. Ce modèle conserve le phénotype du type de tissu bronchique dont sont issues les cellules primaires.

Plus spécifiquement, mes travaux de thèse ont eu pour objectifs de comprendre : i) les propriétés viscoélastiques du mucus à différentes échelles compte-tenu de son hétérogénéité et d'évaluer l'utilisation de la rhéologie du mucus comme marqueur de pathologies ; ii) l'activité ciliaire et la coordination spatiotemporelle du battement ; et iii) le couplage entre les propriétés mécaniques du mucus et la coordination ciliaire pour l'efficacité du transport du mucus. A cette fin, les propriétés viscoélastiques du mucus ont été mesurées sur deux échelles : celle du cil ($\sim 1 \mu\text{m}$) et celle de la couche de mucus ($\sim 50 \mu\text{m}$). Pour cela, des rhéomètres en cisaillement à contrainte ou déformation

imposée pour la macro-rhéologie, et des pincettes optiques pour la micro-rhéologie active avec des billes sondes de 1 à 5 μm de diamètre, ont été utilisés. Ces études nous ont permis d'évaluer l'utilisation de la rhéologie du mucus comme marqueur de la BPCO. De plus, à l'échelle microscopique grâce aux pincettes optiques, des mesures préliminaires de micro-adhésion ont été menées afin de mieux comprendre les propriétés mécaniques du mucus, son hétérogénéité et sa structure. Les pincettes optiques nous ont également permis de développer une étude originale du mucus directement sur le tissu. Cette approche permet d'éviter un biais ou une altération du mucus par le processus de prélèvement et surtout de sonder l'hétérogénéité du mucus sur le tissu et la variation de ses propriétés rhéologiques en fonction de la distance aux cellules. Deuxièmement, l'activité ciliaire et l'efficacité du transport associé ont été étudiées à partir d'enregistrement en vidéo-microscopie à haute vitesse d'acquisition pour diverses conditions (pathologie, viscoélasticité du mucus, réduction de la concentration en calcium Ca^{2+} et de sa régulation, tabac et maturité de la culture). Le développement d'un outil original de traitement et d'analyse des vidéos nous a permis d'étudier la coordination spatio-temporelle du battement ciliaire à l'échelle locale, de la cellule ciliée à une dizaine de cellules. L'étude à l'échelle de la cellule en particulier nous a permis de mettre en évidence ses différents modes de battement qui sont variables dans l'espace et dans le temps.

La présentation de mon projet de thèse et de mes résultats se déroule comme suit.

Le premier chapitre décrit les propriétés de l'épithélium bronchique et la fonction mucociliaire. Les enjeux médicaux qui y sont liés, notamment au travers de quatre pathologies respiratoires chroniques que sont, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme, la mucoviscidose et la dyskinésie ciliaire, y sont exposés. Ce chapitre se clôt sur la description du modèle de culture d'épithélium bronchique dont sont issus les échantillons pour ce projet.

Le second chapitre constitue la partie I sur les propriétés d'écoulement du mucus. Elle se divise tout d'abord en une partie introductive sur l'état de l'art concernant le mucus, de sa composition à ses propriétés mécaniques. Puis les méthodes et techniques utilisées pour mesurer la rhéologie du mucus, en macro-rhéologie de cisaillement et en micro-rhéologie active avec des pincettes optiques, seront détaillées avec les détails sur les protocoles de mesure. Enfin les résultats obtenus sur le comportement rhéologique du mucus, à partir de prélèvements ou sondés directement sur l'épithélium, seront présentés sous forme de deux articles. Ce chapitre se clôture sur des conclusions et des perspectives sur la problématique des propriétés mécaniques du mucus.

Le troisième chapitre, nommé partie II, présente le deuxième axe de ma thèse sur la quantification et la compréhension de la coordination spatio-temporelle de l'activité ciliaire et du transport du mucus associé. Tout comme la partie I, il comporte tout d'abord une partie introductive décrivant l'état de l'art sur les cils motiles, leur structure et les mécanismes de coordination, ainsi que la caractérisation du transport du mucus sur les épithélia ciliés. Puis les méthodes et outils utilisés pour imager et analyser l'activité ciliaire, quantifier la coordination spatio-temporelle et mesurer le champ de vitesse du transport du mucus, sont présentés. L'outil original développé pour quantifier la coordination est

présenté sous forme d'article. Les résultats sur l'activité ciliaire et le transport dans le mucus sont d'abord obtenus avec des outils standards (densité de cils motiles, fréquences de battement et champ de vitesse du mucus), pour différents épithelia et différentes conditions expérimentales (pathologie du patients, drogues, propriétés du fluide, maturité de la culture, ...). Les résultats obtenus pour la quantification de la coordination spatio-temporelle avec le nouvel outil d'analyse du battement sont ensuite décrits à l'échelle de la cellule ciliée, ainsi qu'à l'échelle de quelques cellules. Une partie exposant les conclusions et les perspectives sur la problématique de la coordination ciliaire et du couplage avec les propriétés du fluide pour l'efficacité du transport clôture ce chapitre.

EPITHELIUM BRONCHIQUE ET FONCTION MUCOCILIAIRE

1. Physiologie de l'épithélium bronchique

Nos voies aériennes (nez, trachée, bronches) sont recouvertes d'un tissu cellulaire, l'épithélium. Cet épithélium, d'une épaisseur d'environ 20 μm dans la trachée et les bronches (Chu et al. 2016; Gras et al. 2012) pour des sujets sains, comporte plusieurs types cellulaires. A la base du tissu, en contact avec le cartilage, il y a des cellules basales (Figure 1A) qui représentent environ 30% des cellules de l'épithélium (Rock et al. 2009). La surface du tissu est composée principalement de trois types cellulaires : des cellules ciliées, munies de nombreux cils motiles ; des cellules caliciformes, sécrétant un fluide : le mucus, avec un rapport d'environ une cellule caliciforme pour cinq cellules ciliées (Breeze and Wheeldon 1977), et des cellules club, des cellules sécrétrices immunitaires (anciennement nommées cellules de Clara) (Figure 1A).

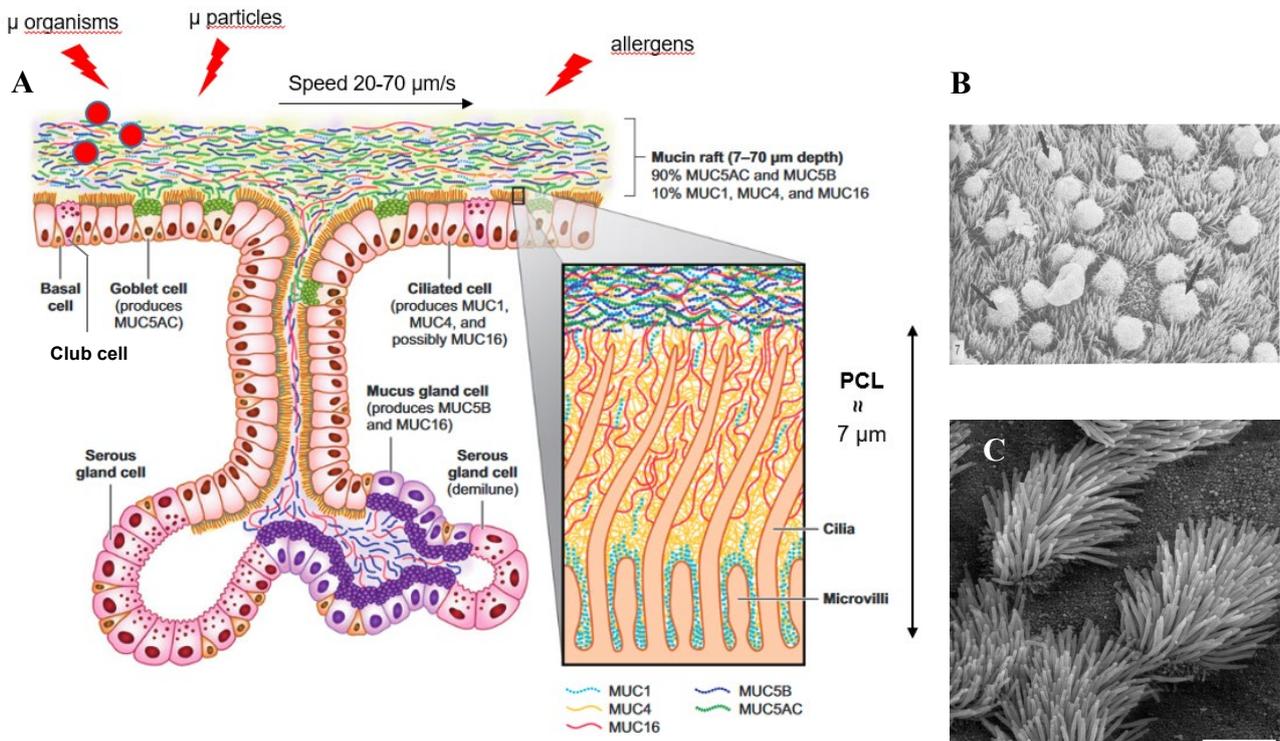


Figure 1: Schéma de l'épithélium bronchique et de la fonction mucociliaire. A) Schéma de l'épithélium bronchique avec les différents types cellulaires : basales, ciliées, caliciformes, clubs ; mais aussi les zones glandulaires avec les cellules séreuses. Les différents types de glycoprotéines sécrétées, appelées mucines, sont représentés en filaments de couleur dans le zoom à droite. La couche péri-ciliaire dans laquelle baignent les cils est notée PCL. La figure est issue et adaptée de (Hatrup and Gendler 2008). B) Image en microscopie électronique à balayage de l'épithélium bronchique humain ex vivo illustrant la dominance des cellules ciliées. Les flèches montrent les cellules caliciformes mais elles peuvent visuellement être confondues avec les cellules club. La figure est issue de l'article de (McDowell et al. 1978). C) Image en microscopie électronique à balayage des cellules ciliées de l'épithélium de la trachée. Barre d'échelle : 5 μm .

L'image a été prise par Charle Daghlian et mise à disposition sur le site <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1253508>.

Les cellules basales sont des cellules ovoïdes de petites tailles à la base de l'épithélium. Elles ont la particularité d'être progénitrices, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier au besoin en un autre type cellulaire, par exemple en cellules ciliées ou caliciformes (Rock et al. 2009). Elles représentent en moyenne 30 % des cellules de l'épithélium bronchique.

Les cellules caliciformes de l'épithélium sécrètent en continu un fluide appelé mucus. Ce mucus est un fluide complexe, viscoélastique et adhésif qui joue un rôle de barrière protectrice et sélective afin d'empêcher les particules, molécules et micro-organismes pathogènes présents dans l'air inhalé, de pénétrer au sein du tissu. Sa composition, sa structure et les propriétés viscoélastiques et adhésives que cela lui confère (voir partie I) sont donc importantes afin de remplir cette fonction de protection. En plus de son rôle de barrière, le mucus doit garder des propriétés d'écoulement lui permettant d'être mis en mouvement et transporté pour évacuer les pathogènes piégés. La présence de ces cellules caliciformes est estimée à 6800 cellules/mm² pour un épithélium sain, soit 5 à 15 % de la surface de l'épithélium en tenant compte de leur largeur, de 5 à 10 µm. Mais cette présence peut atteindre 10 000 cellules/mm², soit 25%, pour certaines pathologies respiratoires entraînant une prolifération de ces cellules (Breeze and Wheeldon 1977). Elles ont une forme de dôme et une texture granulaire à la surface. L'expulsion de mucus par les cellules est irrégulière, le mucus est produit et stocké en leur sein puis sécrété en fonction des besoins (Rhodin 1966). La couche formée sur le tissu a une épaisseur variable entre 7 et 70 µm (Hattrup and Gendler 2008) avec une moyenne autour de 20 µm (Chu et al. 2016) pour des personnes en bonne santé.

Les cellules ciliées et leur battement coordonné ont une fonction de transport du mucus. Le battement régulier permet aussi l'agitation permanente du mucus qui peut aider à piéger les micro-organismes pathogènes. Les cellules ont une forme allongée, avec environ 20 µm de long et 7 µm de large, et s'ancrent à la base de l'épithélium (Breeze and Wheeldon 1977). Ces cellules comportent entre 50 et 200 cils chacune (Breeze and Wheeldon 1977; Rhodin 1966) espacés d'environ 0,2 µm (B. Button et al. 2012). Chaque cil fait entre 5 et 8 µm de long et 0,3 µm de diamètre (Breeze and Wheeldon 1977) (Figure 1C). Les cils ne sont pas directement immergés dans la couche de mucus mais dans un fluide nommé couche péri-ciliaire (abréviation PCL en anglais) (Figure 1). Cette PCL, beaucoup moins visqueuse que le mucus et d'épaisseur proche de la longueur des cils de 6 à 7 µm (B. Button et al. 2012; Chu et al. 2016; L. Liu et al. 2013; Oldenburg et al. 2012), permet le libre battement de ces derniers. Elle est donc primordiale pour le bon fonctionnement des cils et donc du transport du mucus. La composition et l'épaisseur de la PCL est régulée par les microvilli à la base des cellules ciliées, qui font 2 µm de long et 0,1 µm de diamètre (Breeze and Wheeldon 1977). L'équilibre de la PCL repose sur le rapport entre sa pression osmotique constante de 300 Pa et celle du mucus plus variable en fonction de son taux d'hydratation (200 Pa pour une masse aqueuse de 98%) (B. Button et al. 2012). Au-delà d'une pression osmotique critique de 800 Pa de la couche de mucus, la réduction trop importante de la PCL entraîne l'effondrement des cils sur l'épithélium et donc un arrêt du transport par le battement ciliaire (B. Button et al. 2012; L. Liu et al. 2014). La pression osmotique de la PCL peut légèrement s'adapter par modification de son taux d'hydratation et de son épaisseur,

régulées grâce aux microvilli par ajustement de la concentration en ions sodium Na^+ et chlorure Cl^- (Girod et al. 1992). Les cellules ciliées sont majoritaires et représentent 50 à 75 % de la surface de l'épithélium en tenant compte de la proportion de cinq cellules ciliées pour une cellule caliciforme (10-15%) (Breeze and Wheeldon 1977; Rhodin 1966). Elles ont une fréquence de battement entre 5 et 20 Hz (Chu et al. 2016; L. Liu et al. 2013; L. Liu et al. 2014). Il a été démontré que la concentration intracellulaire en calcium Ca^{2+} au sein des cellules ciliées intervient dans la régulation de la fréquence de battement (L. Liu et al. 2014). Les cellules ciliées participent, avec le flux d'air, au transport de la couche de mucus avec une vitesse de l'ordre de la dizaine de micromètre par secondes. Cette vitesse est comprise entre 20 et 40 $\mu\text{m/s}$ dans les bronches (Oldenburg et al. 2012; Foster, Langenback, and Bergofsky 1980; B. Button, Picher, and Boucher 2007) et entre 70 et 90 $\mu\text{m/s}$ dans la trachée (Chu et al. 2016; L. Liu et al. 2013; Foster, Langenback, and Bergofsky 1980).

Les cellules club sont des cellules sécrétrices immunitaires permettant de réguler l'inflammation du tissu ou encore de faciliter la sécrétion des anticorps de l'immunité innée (IgA) contre les pathogènes piégés dans le mucus. Elles ont une forme de dôme à la surface et présente une texture granulaire. Elles recouvrent environ 15 % de la surface de l'épithélium mais avec un accroissement vers les voies aériennes distales (Boers, Ambergen, and Thunnissen 1999). Les cellules club ont également un rôle de cellules progénitrices accessoires en plus des cellules basales (Rock et al. 2009).

La fonction mucociliaire est donc le mécanisme qui permet le nettoyage continu de nos voies respiratoires, évitant ainsi leur agression et l'engagement du système immunitaire adaptatif. Elle s'appelle ainsi en raison du couplage entre la barrière protectrice que constitue le mucus et le battement coordonné des cellules ciliées, pour permettre le transport et l'évacuation du mucus vers le nez et la bouche. Le mucus est continuellement soumis à des forces de cisaillement sous l'action des cils comme présenté plus haut, mais aussi en raison du flux d'air lié à l'inspiration et l'expiration. La force d'un cil, battant à une fréquence d'environ 8 Hz, est estimée à 0,2 nN pendant sa poussée (Teff, Priel, and Ghebery 2007), soit une pression locale par cil d'environ 3 kPa et une pression globale sur la couche de mucus de l'ordre de 100 Pa en fonction du nombre de cils par cellules et de la densité de cellules ciliées à la surface de l'épithélium. Tandis que le flux d'air exerce une contrainte de cisaillement à la surface de la couche de mucus d'environ 0,05 Pa (Fredberg 1978; B. M. Button and Button 2013). La toux, qui est un puissant mécanisme d'évacuation du mucus, prend le relais du battement ciliaire en cas d'augmentation des particules, pathogènes ou allergènes dans l'air ou d'inefficacité de la fonction mucociliaire. Les pressions de cisaillement peuvent alors atteindre 170 Pa (Jones et al. 1975; B. M. Button and Button 2013).

2. Enjeux fondamentaux et médicaux

L'importance des enjeux médicaux liés aux pathologies respiratoires s'est accrûtes ces dernières décennies avec l'augmentation des personnes atteintes, comme le montre la Figure 2. A l'échelle mondiale environ 10% des décès des 15-49 ans en 2010 sont liés aux fonctions respiratoires (tuberculose, infections, maladies chroniques, cancers) dont 2,1% pour les seules pathologies respiratoires chroniques, soit la 3^{ème} cause de mortalité en 2010 (Lozano et al. 2012). Le nombre de patients atteints de maladies chroniques comme l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) n'a cessé d'augmenter, particulièrement dans l'Europe de l'ouest, l'Amérique du nord et l'Asie. Entre 1990 et 2010 le nombre de cas diagnostiqué dans le monde a augmenté de 44,2% pour la BPCO avec 174 millions de cas enregistré en 2015 et de 12,6% pour l'asthme avec 358 millions de personnes atteintes en 2015. La mortalité liée à ces pathologies en 2015 était de 3,5 millions pour la BPCO et 0,4 millions pour l'asthme (Soriano et al. 2017). Ces maladies chroniques, que l'on ne peut toujours pas guérir, peuvent être particulièrement invalidantes et nécessitent des soins constants et réguliers qui ont un coût majeur pour les organismes de santé publique (Pauwels et al. 2001). Au Royaume-Uni par exemple, une mort sur cinq est liée à une pathologie respiratoire (cancer du poumon, maladie respiratoire chronique, tuberculose, ...), et le coût économique de ces pathologies s'est élevé à 6,6 milliards de livre sterling ($\sim 7,5 \cdot 10^{12}$ euros) en 2004 (Hubbard R 2006). De plus l'asthme reste la maladie chronique la plus importante chez les enfants.

Les principales causes avancées de l'augmentation des pathologies respiratoires chroniques associent une modification extrêmement rapide de nos modes de vie modifiant la qualité de l'air inhalé (pollution, fumées, allergènes, composés chimiques toxiques, ...) avec une modification plus lente mais réelle de notre système immunitaire conformément à la théorie hygiéniste (Sbihi et al. 2019). Les modifications de notre microbiote notamment pendant les premières semaines de vie semblent tout particulièrement en cause. Les infections des voies aériennes, en particulier chez l'enfant, sont en majorité dues à la mal et sous-nutrition conduisant à des défenses immunitaires faibles, couplées à un surpeuplement favorisant la diffusion des pathogènes (Ferkol and Schraufnagel 2014).

Les maladies respiratoires chroniques regroupent plusieurs pathologies, comme l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), mais aussi des pathologies d'origine mono ou oligo-génétiques telles que la mucoviscidose ou la dyskinésie ciliaire. Ces quatre pathologies, avec leurs caractéristiques et conséquences, vont être détaillées ci-dessous et résumées dans le Tableau 1.

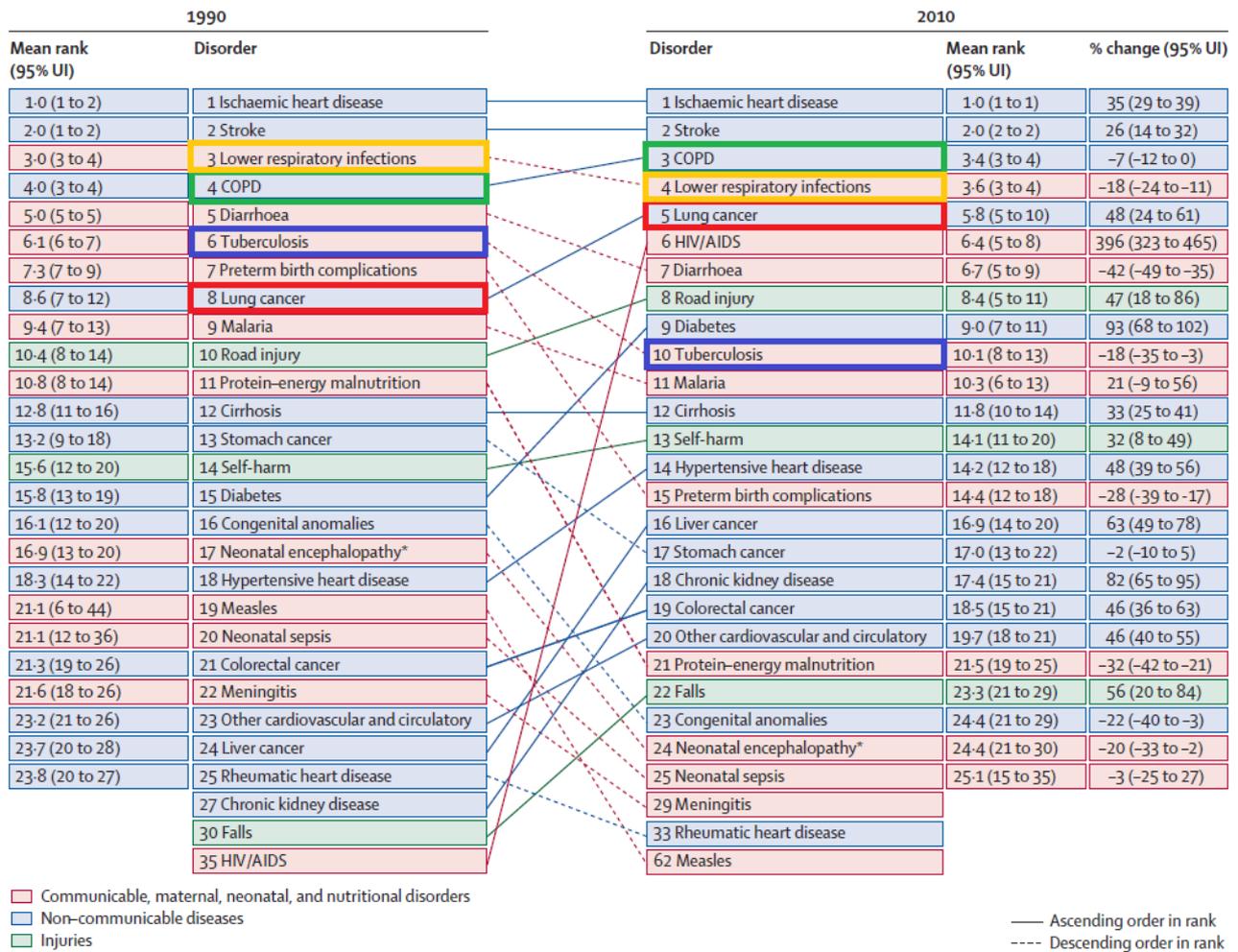


Figure 2 : Changement du rang mondial en nombre de décès entre 1990 et 2010 pour 25 pathologies majeurs à travers le monde. Les pathologies respiratoires sont encadrées en gras et vert pour les maladies chroniques (concernées dans notre projet), en rouge les cancers du poumon, en orange les infections respiratoires et en bleu la tuberculose. La figure est issue de l'article de Lozano et al 2012.

L'asthme se caractérise par une réaction disproportionnée de l'épithélium par l'agression d'agents extérieurs comme les virus, les allergènes ou la pollution (Ferkol and Schraufnagel 2014). Cette réaction provoque l'inflammation particulière du tissu, donc une augmentation de son épaisseur, couplée à une hypersécrétion du mucus (Boucher 2019; Gras et al. 2012). Elle provoque également une desquamation de l'épithélium augmentant ainsi la concentration en débris cellulaires dans le mucus et réduisant la surface de cellules ciliées et donc le transport du mucus. L'addition de ces réactions contribuerait à la formation d'amas de mucus et l'occlusion des moyennes et petites voies aériennes (Dunican et al. 2018). C'est une pathologie très hétérogène dans ses symptômes ce qui complique son diagnostic et sa prise en charge (Bourdin and Chanez 2016; Georas 2018). Globalement, elle est décrite comme une pathologie respiratoire chronique, variable et réversible, avec une brève durée des symptômes et marquée par l'inflammation des voies respiratoires. La sévérité de l'asthme est caractérisée par la fréquence des exacerbations (Bourdin and Chanez 2016).

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) se développe à la suite d'une agression répétée et sur une longue durée de l'épithélium bronchique, comme la fumée (cigarettes, feux de foyer) ou la pollution atmosphérique, couplée à des prédispositions génétiques (Pauwels et al. 2001). Elle se caractérise par une prolifération des cellules caliciformes au détriment des cellules ciliées jusqu'à l'inversion du rapport cellulaire et une augmentation de la surface des glandes sous-muqueuses. Cela conduit à une augmentation de la sécrétion de mucus avec une concentration probablement plus importante en mucines (Boucher 2019). Cette abondance du mucus couplée à l'augmentation de sa concentration en mucines engendrerait une élévation de la pression osmotique de la couche de mucus et provoqueraient la réduction de la couche péri-ciliaire (PCL) jusqu'à l'effondrement des cils. La panne de la fonction mucociliaire ainsi provoquée conduit à une accumulation du mucus et un encombrement voire une obstruction des voies aériennes. De plus, la difficulté de l'évacuation du mucus par la toux à cause de l'augmentation de ses propriétés viscoélastiques (Serisier et al. 2009) et adhésives aggrave ce phénomène. La prolifération des cellules caliciformes se fait également au détriment des cellules immunitaires clubs (Gamez et al. 2015) ce qui augmente les risques d'infections du mucus et d'inflammation du tissu. Les patients BPCO sont diagnostiqués sur la base d'une évidence de l'obstruction irréversible de leur flux d'air. C'est à dire un volume expiratoire maximum à la première seconde (VEMS en français, FEV1 en anglais) sur la capacité vitale forcée (FVC) inférieur à 0,7, et une amélioration du VEMS, après l'inhalation de 200 à 400 µg de salbutamol, inférieure à 12%. La BPCO est déclarée s'il n'y a pas de diagnostic alternatif évident expliquant cette obstruction irréversible du flux d'air, c'est-à-dire pas d'historique d'autres pathologies respiratoires basé sur l'examen clinique et un scanner. Le passif de fumeur et d'exposition professionnelle est également noté, avec une consommation supérieure à 10 paquets par an dans les pays développés et l'appartenance à un corps de métier reconnu au tableau des pathologies professionnelles.

La mucoviscidose est une maladie génétique touchant toutes les muqueuses. La mutation du gène CFTR (pour *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) codant le canal transmembranaire responsable de la régulation des ions chlorure Cl⁻ engendre une diminution de l'ion Cl⁻ dans le mucus sécrété. La concentration des différents ions et cations pour la régulation de la composition du mucus est très importante (voir partie I.1.1.). Le déficit de chlorure dans le mucus provoque sa déshydratation par réabsorption de l'eau et du sodium Na⁺ par les cellules épithéliales. Le mucus devient donc plus concentré, ce qui augmente ses propriétés viscoélastiques et adhésives (Tang et al. 2016; Boucher 2019; Serisier et al. 2009). C'est une pathologie létale notamment à cause de ses impacts sur le mucus respiratoire et la panne de la fonction muco-ciliaire et du dégagement par la toux que cela engendre. On retrouve les mêmes conséquences que pour la BPCO : réduction de la PCL, effondrement des cils (Shei, Peabody, and Rowe 2018), mucus trop viscoélastique et adhésif pour être évacué par la toux et obstruction des voies respiratoires par le mucus. De plus la dérégulation de la composition du mucus à cause de l'absence du canal CFTR augmente les risques infectieux au sein du mucus (Serisier et al. 2009), aggravées par la panne de son évacuation, mais aussi par d'autres effets perniciose de cette mutation, comme le diabète par exemple.

La dyskinésie ciliaire primitive est une maladie génétique rendant les cils peu ou non motiles à cause de modifications ou d'altérations des gènes permettant le codage des éléments constitutifs du cil (tubulines, moteurs moléculaire (voir partie II.1.1.)). Cette dyskinésie empêche donc la fonction mucociliaire entraînant une accumulation du mucus dans les voies aériennes (Boucher 2019).

		BPCO	Asthme	Mucoviscidose	Dyskinésie ciliaire
Causes	Génétiques (mutation +++ ou prédisposition +)	+	+	+++	+++
	Fumée (cigarettes, feux de foyer, ...)	+	+	-	-
	Pollution atmosphérique	+	+	-	-
	Allergènes	-	+	-	-
Caractéristiques	Prolifération des cellules caliciformes	+	+/-	+/-	-
	Augmentation de la surface des glandes sous muqueuses	+	+/-	+/-	-
	Hyper sécrétion	+	+	-	-
	Inflammation	+/-	+++	+	-
	Desquamation du tissu	-	+	-	-
	Cils peu ou non motiles	+/-	-	-	+
	Dérégulation de la concentration ionique du mucus	+/-	-	+	-
Conséquences	Augmentation de l'épaisseur de la couche de mucus	+	+	+	+/-
	Augmentation de l'épaisseur de l'épithélium	+++	+	-	-
	Modification de la composition et des propriétés mécaniques du mucus	+/-	+/-	+	-
	Augmentation de la pression osmotique de la couche de mucus et réduction de la PCL	+	+/-	+++	+/-
	Diminution de la population de cellules ciliées	+	+/-	+/-	+/-
	Réduction ou arrêt du transport mucociliaire	+/-	+/-	+	+++
	Risque infectieux	+	+	+++	+++
	Obstruction des voies aériennes distales	+++	+++	+++	+/-

Tableau 1 : Résumé des causes, caractéristiques et conséquences pour les quatre pathologies respiratoires chroniques ciblées que sont la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme, la mucoviscidose et la dyskinésie ciliaire. Le symbole « - » indique que le paramètre n'est

pas impliqué ou exprimé dans la pathologie, « +/- » que cela n'est pas toujours le cas ou que l'état de l'art n'est pas tranché sur le sujet, « + » que le paramètre est bien présent dans la pathologie et « +++ » que le paramètre est dominant et symptomatique de la maladie. Dans la partie conséquence, celles représentées en gras sont les conséquences terminales pouvant être mortelles.

Face aux enjeux médicaux des pathologies chroniques respiratoires, et aux problématiques économiques posées par leur prise en charge, bien comprendre le fonctionnement de l'épithélium bronchique et de la fonction mucociliaire représente une potentielle ouverture vers des opportunités thérapeutiques à ce jour inexistantes. La fonction mucociliaire est complexe, elle repose sur les propriétés mécaniques particulières du mucus et la bonne coordination du battement des cellules ciliées pour permettre le transport efficace de la couche de mucus. Bien qu'explorés ces dernières années, les propriétés du mucus et leurs conséquences sur la fonction mucociliaire ne sont pas encore bien connues. Cela est notamment dû à la complexité du mucus, à sa composition, aux diverses interactions possibles entre ses composants et leurs effets sur les propriétés mécaniques du mucus. De plus, le couplage entre les propriétés mécaniques du mucus et la coordination ciliaire est encore mal compris. Or, bien comprendre cette fonction mucociliaire et les différentes interactions entre le mucus et la coordination du battement est une étape indispensable pour élaborer des remèdes adaptés et permettre le soin des patients. De plus, une meilleure compréhension de cette fonction permettra également un diagnostic plus précis de ces pathologies et donc une meilleure prise en charge.

Mon projet de thèse vise à mieux comprendre le couplage entre propriétés mécaniques du mucus et coordination du battement ciliaire. Pour ce faire une étude des propriétés viscoélastiques du mucus et de son hétérogénéité a été menée, à l'échelle de la couche sur le tissu et à l'échelle d'un cil, particule ou micro-organisme. En parallèle, une caractérisation de l'activité ciliaire a été faite. La coordination du battement ciliaire sur différentes échelles spatiales et temporelles a été mesurée et quantifiée. Enfin, le champ de vitesse de transport du mucus sur l'épithélium a été mesuré et comparé, pour différentes conditions de viscoélasticité du mucus et différentes densités de cellules ciliées, afin d'évaluer l'efficacité de la fonction mucociliaire et mieux comprendre le couplage entre ces deux composantes.

3. Le modèle d'épithélium bronchique humain

3.1. La culture ALI (Air Liquid Interface) d'épithélium bronchique humain

Les bronches ne sont pas une zone facile d'accès et obtenir des échantillons de leurs épithéliums complets et exploitables est difficile. Pour pouvoir travailler sur l'épithélium bronchique, un modèle de culture a été mis en place afin de reproduire un tissu complet et fonctionnel *in vitro* depuis les années 2000 (Jeffery, Holgate, and Wenzel 2003). Les cellules primaires sont obtenues lors d'un prélèvement du tissu par biopsie bronchique durant un examen médical de bronchoscopie, ou, plus rarement, par anneau bronchique (un morceau de bronche de quelques millimètres de long) lors d'une opération chirurgicale du poumon. Le modèle de culture de l'épithélium bronchique se caractérise par une différenciation cellulaire en interface avec l'air pour reproduire les conditions naturelles, d'où son nom de modèle ALI pour Air-Liquid Interface. La culture présente cinq grandes étapes, comme illustrée dans la Figure 3.

Premièrement les cellules épithéliales sont extraites de la biopsie par dissociation mécanique. La biopsie est plongée dans du PBS, une solution tampon, pendant une nuit (~12h) à 4°C dans un tube rotatif horizontal. Le tube est ensuite centrifugé 5 min à 1500 tours/min et le surnageant de PBS est retiré. Ensuite 1 mL de milieu nutritif est ajouté dans le tube et la dissociation mécanique est finalisée par pipetages répétés. Pour clore cette première phase, les cellules extraites et le reste de la biopsie sont déposées dans un puits avec le milieu. Au bout de 48 à 72h à 37°C, les cellules progénitrices (principalement des cellules basales) bien extraites de la biopsie ont adhéré au fond du puits. Le puits est rincé au PBS afin d'enlever le reste de la biopsie et les cellules non adhérentes.

La deuxième phase peut ensuite commencer en laissant incubé à 37°C les cellules adhérentes au fond du puits dans 1 mL de milieu nutritif dédié à l'expansion cellulaire. La dimension du puits dans la deuxième phase ne doit pas être trop petite pour permettre une densité de cellules suffisante afin qu'elles puissent se multiplier. En effet si les cellules sont trop éloignées les unes des autres elles ne se multiplieront pas, d'où l'utilité de cette phase et de ne pas mettre en flasque immédiatement après l'extraction des cellules de la biopsie.

Lorsque les cellules progénitrices se sont suffisamment multipliées, jusqu'à recouvrir 50 à 75% de la surface du puits, la troisième phase d'expansion en flasque peut débuter. La deuxième phase est arrêtée après une expansion jusqu'à 50-75% de la surface seulement et non 100% car il ne faut pas non plus que les cellules s'épuisent à se multiplier. Pour la même raison la troisième phase en flasque s'arrête lorsque 70 à 80% de la surface est recouverte par les cellules.

La quatrième phase est également une phase d'expansion mais les cellules sont placées sur une membrane poreuse afin de préparer la cinquième et dernière phase de culture. Elle dure jusqu'à l'atteinte de la confluence, c'est-à-dire que les cellules tapissent toute la surface du filtre.

La dernière phase est le passage des cellules en interface avec l'air afin de faciliter la différenciation des cellules progénitrices, notamment en cellules ciliées, caliciformes et club. Le milieu de culture est retiré de la face supérieure du filtre qui est donc mis en contact avec l'air. Au bout de quelques jours, voire semaines, de cette cinquième phase, le tissu est jugé bien différencié, c'est-à-dire représentatif du phénotype cellulaire de l'épithélium bronchique *in vivo*.

3.2. Les cultures ALI étudiées au cours du projet

Durant mon projet, j'ai eu accès à des cultures issues de trois groupes de patients : des témoins, des fumeurs et des patients atteints de BPCO. Les témoins sont des sujets sains, sans pathologie respiratoire et n'ayant jamais fumé. Les fumeurs sont des personnes saines, sans pathologie respiratoire et sans réduction du débit d'air (mesuré en spirométrie), fumant ou ayant fumé. Tous les sujets fumeurs ou anciens fumeurs sont regroupés, quel que soit la fréquence du tabagisme passé ou actuelle et la durée du sevrage pour ceux ayant arrêtés, bien que ces données nous soient connues. Les patients BPCO sont diagnostiqués sur la base d'une évidence de l'obstruction irréversible de leur flux d'air, un passif de fumeur et sans diagnostic alternatif évident (voir description de la BPCO dans la partie sur les enjeux médicaux en introduction).

Les prélèvements de biopsies et la mise en culture ont été effectués à l'hôpital universitaire Arnaud de Villeneuve de Montpellier suivant le protocole approuvé par la commission éthique institutionnelle de Sud Méditerranée III (CHRU Montpellier - AOI 9244 – NCT02354677). Tous les patients donateurs de biopsies pour la recherche ont signé un formulaire de consentement, après avoir été informés de l'utilisation de leur donation pour la recherche biomédicale sur l'épithélium bronchique. Les caractéristiques médicales de ces patients sont bien connues. Nos prélèvements sont issus du lobe inférieur gauche des patients. La mise en culture a été réalisée par Aurélie Petit et Charlotte Vernisse au sein de cet hôpital.

Jusqu'à fin 2017, les cultures ont été réalisées en utilisant des milieux provenant de la société Lonza (Basel, Suisse) selon le protocole de Gras et al 2012 (Gras et al. 2012) et Gamez et al 2015 (Gamez et al. 2015). Un aperçu de la composition de ces milieux est donné par Fulcher et al. 2005 (Fulcher et al. 2005). La première phase d'extraction est celle décrite plus haut en utilisant le milieu nutritif d'expansion BEGM (Lonza, référence CC-3170). La deuxième phase se fait dans un petit puits de 1,1 cm² de superficie, toujours avec le milieu BEGM, et dure de 7 à 10 jours. La troisième phase, en monocouche dans une flasque (0,75 cm²), est faite toujours dans le milieu BEGM pendant environ 2 semaines. Pour la quatrième phase les cellules, environ 350 000 par puits, sont transférées sur un filtre poreux (Transwell Clear, Costar) de 24 mm de diamètre et avec des pores de 0,4 µm, dans un mélange 1:1 de milieu BEGM et DMEM (Lonza, référence BE12-707F). Cette phase dure 2 à 6 jours jusqu'à l'obtention de la confluence. La cinquième phase en interface air-liquide utilise le même mélange de milieux que la quatrième phase juste dans la chambre basale du puits (Figure 3). Il faut attendre 21 à 28 jours avant d'obtenir un épithélium mature (d'après la société Lonza), avec

3. Le modèle d'épithélium bronchique humain

des cellules polarisées et différenciées correspondant à un phénotype d'épithélium bronchique. Globalement, cette méthode met deux mois au total après la biopsie pour obtenir un tissu différencié et fonctionnel avec un taux de succès de 48% (312 succès sur 650 mises en culture) (Figure 3). Le phénotype exprimé à 28 jours après le passage en ALI est de $22,6 \pm 7,9$ % de cellules ciliées, $8,0 \pm 2,80$ % de cellules caliciformes et $17,6 \pm 12,8$ % de cellules club pour le groupe témoin (N = 4). Il est pour le groupe fumeur (N=4) et le groupe BPCO (N=5) de respectivement : $7,5 \pm 1,5$ % et $2,2 \pm 1,7$ % de cellules ciliées ; $13,8 \pm 3,9$ % et $18,5 \pm 6,7$ % de cellules caliciformes ; et $81,9 \pm 37,7$ % et $32,0 \pm 14,5$ % de cellules club. Le pourcentage de cellules ciliées est obtenu par le marquage de la tubuline (β -tubulin IV), une protéine qui compose notamment les cils. Les deux autres types de cellule sont des cellules sécrétrices et le marquage est effectué sur des protéines qu'elles sécrètent spécifiquement : la glycoprotéine MUC5AC pour les cellules caliciformes et la protéine CCSP (Club Cell Secretory Protein) pour les cellules club. L'épaisseur moyenne de l'épithélium est de 19 ± 3 μm d'après Gras et al 2012 (Gras et al. 2012), qui travaillent en collaboration avec nous sur le modèle ALI à Marseille. Depuis mi 2017, le taux de succès de cette méthode avec le milieu fourni par Lonza a considérablement chuté et début 2018 la société Biopharma a suspendu la livraison de ses milieux.

Depuis janvier 2018, l'équipe d'Arnaud Bourdin utilise donc un autre milieu de culture fourni par Stemcell Technologies, en suivant leur protocole. Les étapes sont les mêmes que précédemment, mais l'utilisation du nouveau milieu a réduit le nombre initial de cellules requis et la durée des étapes (Figure 3). Cela est dû au milieu qui augmente probablement la viabilité des cellules et leur capacité d'expansion. Une étude menée par Hou et al (Hou et al. 2017a) de Stemcell Technologies montre que le taux de prolifération des cellules est environ quatre fois plus élevé avec le milieu PneumaCult-Ex Plus (Stemcell Technologies) qu'avec le milieu BEGM (Lonza). Les quatre premières phases sont réalisées dans le milieu PneumaCult-Ex Plus (Stemcell Technologies) avec des durées respectives : d'une semaine maximum pour la deuxième phase, dans un puits plus grand qu'avec le milieu BEGM, de $3,5$ cm^2 de superficie ; entre 2 et 5 jours pour la troisième phase en flasque de $0,75$ cm^2 ; et 2 à 6 jours pour la quatrième phase sur filtre poreux toujours de 24 mm de diamètre, mais avec nombre de cellules déposées au départ de seulement 110 000 environ par puits. La cinquième phase en ALI se fait dans le milieu PneumaCult ALI maintenance (Stemcell Technologies) avec un épithélium bien différencié en seulement 14 à 21 jours (d'après la société Stemcell Technologies). Globalement, cette méthode met 1 mois à 1 mois et demi maximum suivant la biopsie pour obtenir un épithélium bronchique fonctionnel avec un taux de succès de 84% au sein de notre équipe (52 succès sur 62 mises en culture).

Les cellules sont cultivées et maintenues à 37°C dans une atmosphère saturée d'humidité à 5% de CO_2 dans un incubateur. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours.

Nous avons évoqué ci-dessus les différences en termes de vitesse de prolifération et de différenciation du modèle de culture ALI entre le milieu BEGM et le milieu PneumaCult. La vigueur

et la rapidité du développement du tissu avec le milieu PneumaCult permettent une disponibilité des échantillons plus constante dans le temps avec également l'utilisation de cellules primaires congelées réduisant la dépendance à l'obtention de biopsies. Mais la modification du milieu entraîne également des modifications sur les caractéristiques de l'épithélium obtenu à maturité, notamment sur la taille et la cohésion des cellules et le phénotype cellulaire exprimé (pourcentage de chaque type de cellule). Ainsi, les cellules sont globalement plus petites avec le milieu PneumaCult qu'avec le milieu BEGM et forment un tissu plus homogène, comme l'illustre la Figure 4, bien qu'il arrive quelque fois d'obtenir des tissus homogènes avec BEGM et inversement (bien que très rare) des tissus hétérogènes avec PneumaCult. La cohésion cellulaire, indirectement mesurée avec la TEER (TranEpithelial Electrical Resistance), est plus importante sur les épithéliums utilisant le milieu PneumaCult, le pourcentage de cellules ciliées est nettement supérieur et la surface couverte par les cellules caliciformes est plus faible (Figure 5) (Hou et al. 2017b). Le volume de production du mucus est plus faible et avec un aspect nettement plus visqueux et adhésif.

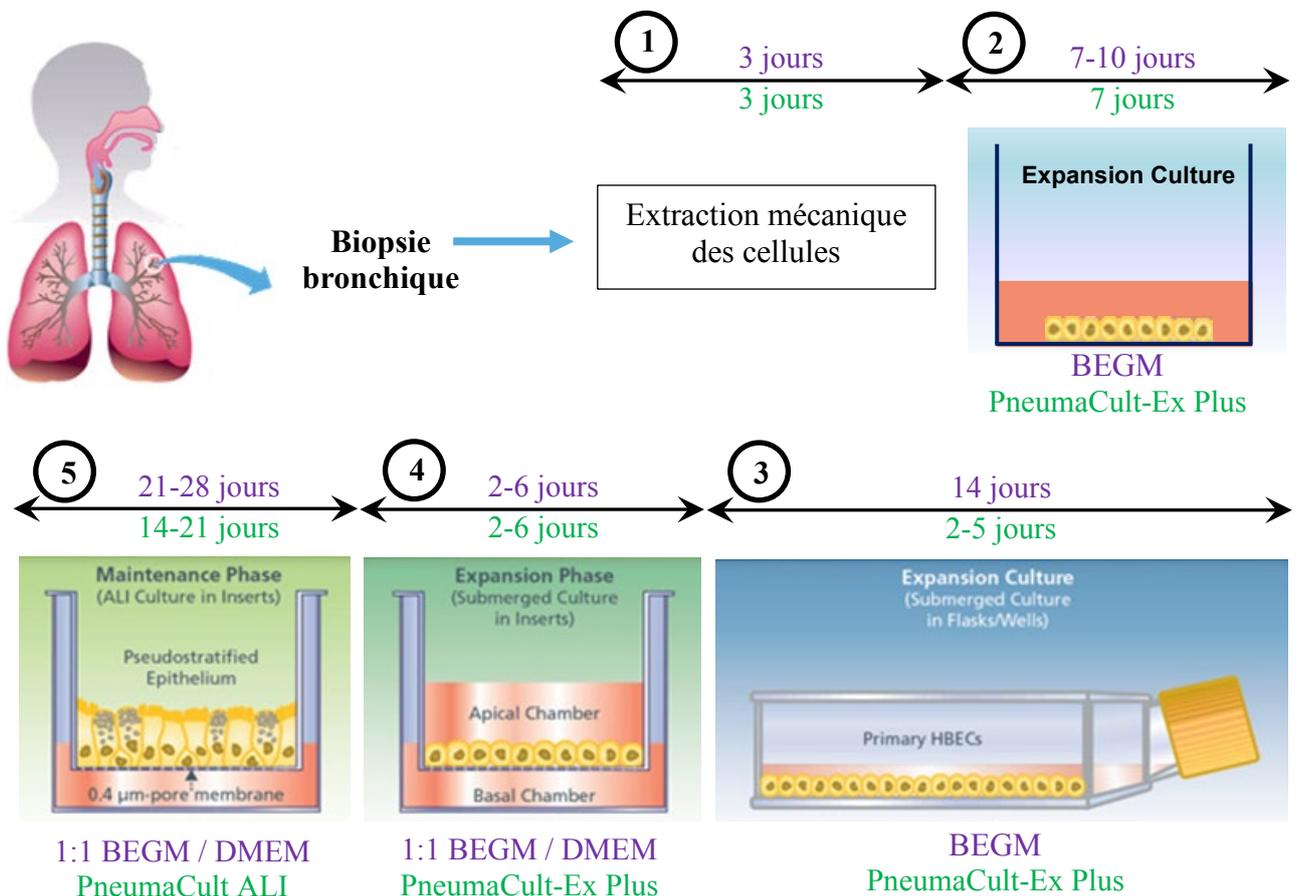


Figure 3 : Schéma du protocole de culture d'épithélium bronchique en interface air-liquide (ALI). Après l'obtention de la biopsie bronchique, le processus de culture peut être découpé en 5 phases : 1) L'extraction mécanique des cellules de la biopsie ; 2) 1^{ère} étape d'expansion cellulaire dans un puits ; 3) 2^{ème} étape d'expansion cellulaire dans une flasque ; 4) phase d'expansion cellulaire sur le filtre poreux ; 5) phase de différenciation en interface air liquide (ALI). La durée de chaque phase et le milieu utilisés sont indiqués en violet et en vert pour respectivement le protocole avec le milieu BEGM (Lonza) et celui avec le milieu PneumaCult (Stemcell Technologies). Schéma adapté de celui fourni par Stemcell Technologies sur son site (<https://www.stemcell.com/pneumacult-ali-medium.html>).

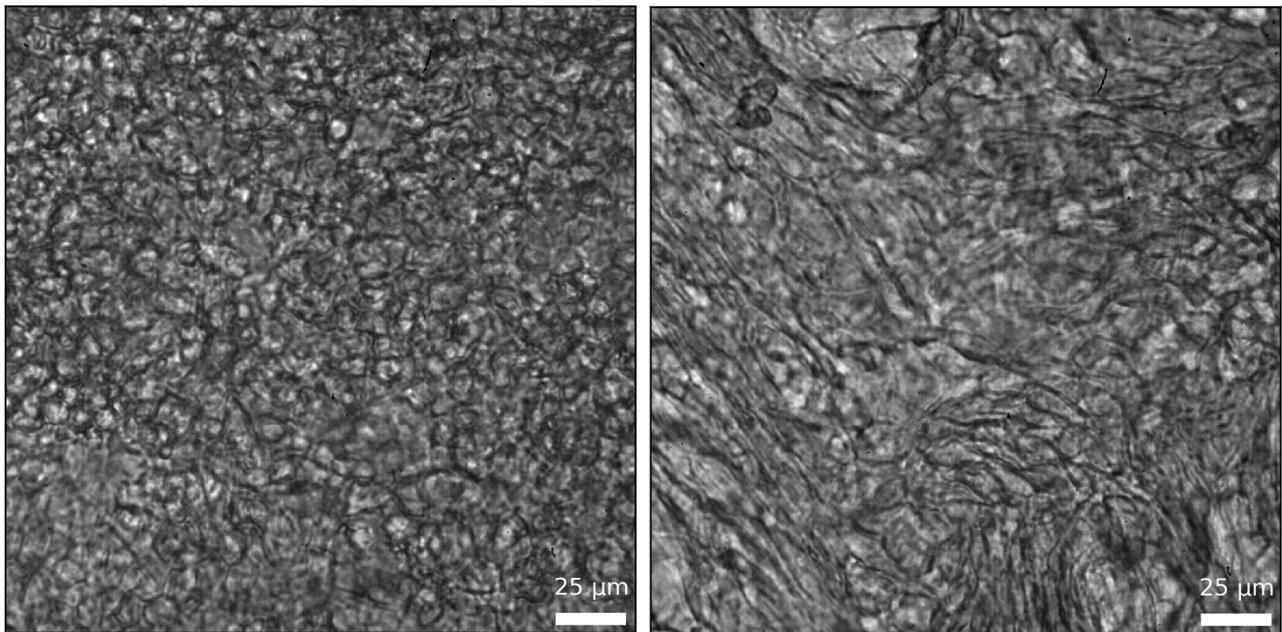


Figure 4 : Illustration de l'épithélium bronchique issu des cultures ALI. A) Tapis cellulaire homogène bien cohésif. B) Tapis cellulaire hétérogène avec des cellules de tailles diverses, déformées et étirées. Les deux exemples sont issus de cultures avec le milieu BEGM (Lonza). Barre d'échelle : 25 µm.

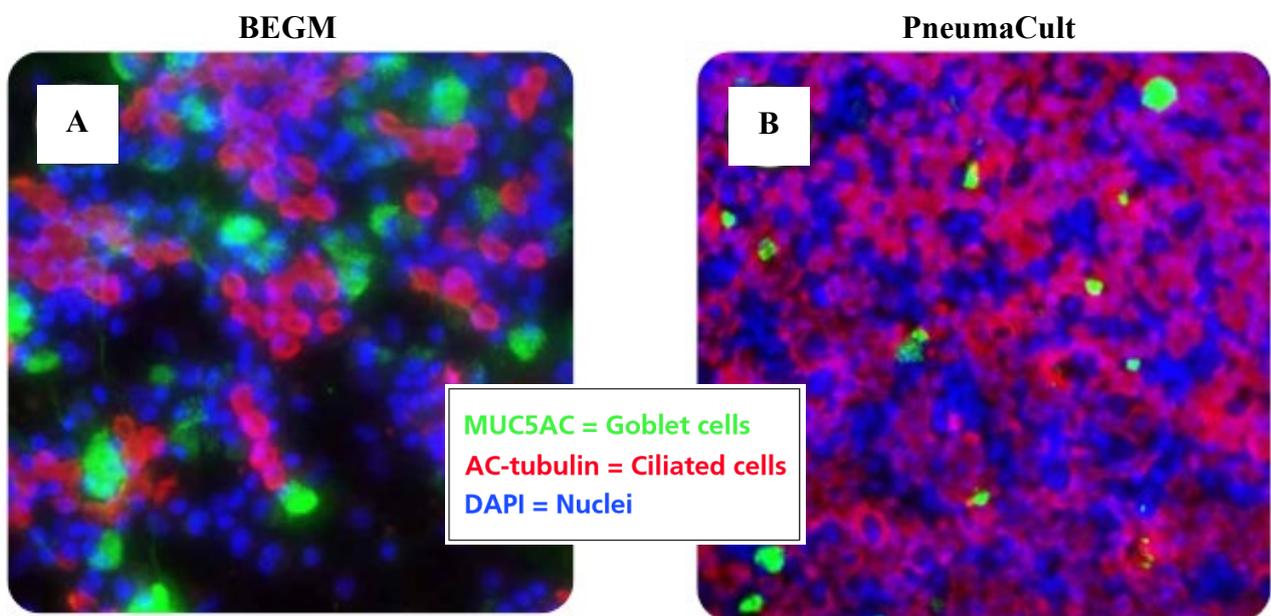


Figure 5 : Comparaison de l'effet du milieu de culture utilisé, entre A) BEGM (Lonza) et B) PneumaCult-Ex Plus (Stemcell Technologies), sur le phénotype cellulaire exprimé des cultures ALI d'épithélium bronchique humain, 28 jours après le passage en interface air-liquide. Après lavage du tissu et retrait de la couche de mucus, trois types de marquage sont appliqués : la glycoprotéine MUC5AC (vert) produite par les cellules caliciformes ; la tubuline AC (rouge) qui constitue notamment les cils ; et l'ADN (bleu) dans le noyau des cellules. Les images sont prises avec un grossissement x20 et issues d'une étude de Hou et al.

PARTIE I : PROPRIETES D'ÉCOULEMENT DU MUCUS

Plan détaillé de la première partie

I.1. Etat de l'Art sur le mucus	25
I.1.1. Composition du mucus	25
I.1.2. Propriétés des mucines et structure du réseau	27
I.1.3. Rhéologie du mucus	31
I.1.4. Propriétés adhésives du mucus	41
I.1.5. Conclusion : le mucus un fluide complexe	45
I.2. Méthodes expérimentales et prélèvements du mucus	47
I.2.1. Origines des échantillons de mucus	47
I.2.2. Rhéologie	50
I.2.2.1. Principes	50
I.2.2.2. Macro-rhéologie de cisaillement	52
I.2.2.2.1. Choix du rhéomètre et de la géométrie	52
I.2.2.2.2. Conditions expérimentales	54
I.2.2.3. Micro-rhéologie et mesures de forces avec un piège optique	59
I.2.2.3.1. Présentation des Pincettes Optiques.....	59
I.2.2.3.2. Détermination de la raideur du piège optique.....	62
I.2.2.3.3. Micro-rhéologie active	64
I.2.2.3.4. Mesures de force d'adhésion.....	71
I.2.2.3.5. Analyse des données	72
I.2.2.3.6. Préparation des échantillons.....	72
I.2.3. Mesure de la composition biochimique du mucus	77
I.2.3.1. Mesure de la masse sèche avec un appareil d'Analyse Thermo-Gravimétrique (ATG)	77
I.2.3.2. Mesure du pH	78
I.2.3.3. Mesure de la concentration en électrolytes et protéines	78
I.2.4. Images de la structure par microscopie électronique à balayage (cryo-SEM).....	79
I.3. Résultats sur la rhéologie du mucus	80
I.3.1. Article 1 : Comparaison des propriétés viscoélastiques du mucus à l'échelle macro- et microscopique	80
I.3.1.1. Présentation de l'article 1	80
I.3.1.2. Article 1 : "Rheology of mucus from ALI (Air Liquid Interface) cultures of human bronchial epithelium"	81
I.3.2. Article 2 : Evolution de la micro-viscoélasticité du mucus sur la culture en fonction de la distance au tissu et comparaison avec du mucus prélevé <i>in vivo</i>	121

I.3.2.1. Présentation de l'article 2	121
I.3.2.2. Article 2 : "Mucus microrheology measured on human bronchial epithelium culture"	122
I.4. Conclusions et Perspectives	143

I.1. Etat de l'Art sur le mucus

Le mucus est un fluide complexe, viscoélastique et adhésif, qui sert de barrière protectrice et sélective, ainsi que lubrifiante (Lieleg and Ribbeck 2011; Leal, Smyth, and Ghosh 2017; Bansil and Turner 2018). Ce fluide est sécrété sur les parois d'organes en contact avec le milieu extérieur, tel que le système respiratoire, mais aussi le système gastro-intestinal, les voies reproductives et la surface oculaire. D'autres espèces que les mammifères comme des poissons, des amphibiens ou des invertébrés possèdent du mucus sur leur peau comme protection physico-chimique et immunitaire mais aussi avec des fonctions locomotrices (Ewoldt et al. 2007). Il existe donc différents mucus, adaptés à leurs fonctions et aux organes qu'ils protègent. Dans cette partie seront discutés la composition, la structure, les propriétés viscoélastiques et adhésives des mucus chez les mammifères, et en particulier celui des bronches.

I.1.1. Composition du mucus

Le mucus est composé en grande majorité d'eau, entre 90 et 99 % (Lai et al. 2009a; Leal, Smyth, and Ghosh 2017; Bansil and Turner 2018). Celui des voies respiratoires est particulièrement aqueux pour des sujets sans pathologie (Tableau 2). Mais il faut noter des différences de concentration en fonction du type d'échantillon avec 93 à 98% d'eau pour des prélèvements de mucus bronchique *in vivo* (Potter et al. 1963), 96 à 98 % pour des expectorations et environ 98% pour du mucus issu de cultures (Boucher 2019). La part non aqueuse restante est constituée de minéraux, protéines, lipides, et ADN.

Les minéraux. Beaucoup de minéraux essentiels sont présents dans le mucus, contribuant à environ 0,5 à 1,1% de la masse totale (Lai et al. 2009a; Thomases 2015; Leal, Smyth, and Ghosh 2017; Bansil and Turner 2018), sous forme d'électrolytes. Cette part est d'environ 1 % dans le mucus respiratoire (Boucher 2019; Potter et al. 1963) (Tableau 2). Les électrolytes présents sont : le sodium Na^+ , le calcium Ca^{2+} , le potassium K^+ , le magnésium Mg^{2+} , le chlorure Cl^- et le bicarbonate HCO_3^- . Les électrolytes interagissent avec les chaînes de mucines chargées négativement (voir partie I.1.2. sur les mucines) et peuvent modifier la structure du réseau en modifiant les interactions électrostatiques entre les chaînes. Les cellules caliciformes peuvent à tout moment contrôler et adapter la concentration de ces électrolytes afin de modifier le taux d'hydratation et la structure du mucus, et donc ses propriétés viscoélastiques et adhésives (Girod et al. 1992; Bansil and Turner 2018). Par exemple, l'augmentation de la concentration en cations divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} cause densification du mucus, alors que l'augmentation de cations monovalents tels que Na^+ et K^+ permet sa fluidification et la réduction de sa viscosité. Le bicarbonate aide à maintenir un pH de 7 à proximité de l'épithélium, son rôle est particulièrement important dans le cas du mucus gastrique avec un pH compris entre 1 et 2 pendant la digestion (Celli et al. 2007a). Les variations de pH entraînent une modification de la viscoélasticité du mucus avec une gélification en dessous de 4 (Celli et al. 2007a; Bansil et al. 2013). Le pH du mucus respiratoire est globalement neutre de 6,5 à 7,9 dans

la trachée et les bronches et légèrement plus acide dans le nez de 5,5 à 6,5 (McShane et al. 2003; Leal, Smyth, and Ghosh 2017).

Les protéines. Les protéines sont la composante biochimique la plus importante qui confère au mucus sa structure et ses propriétés mécaniques complexes. 186 protéines différentes ont été répertoriées dans le mucus des voies respiratoires (Bansil and Turner 2018). Les protéines peuvent être divisées en 7 catégories correspondant à leurs fonctions : défensives (anticorps), enzymatiques, de transport, régulatrices, contractiles (par exemple l'actine, la myosine et la tubuline), de réserve (en acides aminés), et enfin les architecturales dont font parties les glycoprotéines que sont les mucines typiques du mucus. Ces mucines composent 0,2 à 5 % de la masse du mucus (Leal, Smyth, and Ghosh 2017; Bansil and Turner 2018). Ce pourcentage est de 0,3 % pour le mucus respiratoire sur les 1,1 % de protéines qu'il contient (Tableau 2) (Boucher 2019; Bansil and Turner 2018; Potter et al. 1963).

Les lipides. Le mucus contient également plusieurs lipides, de 1 à 2 % de sa masse (Lai et al. 2009a; Thomases 2015; Bansil and Turner 2018). Une part importante de ces lipides sont des phospholipides (~25% des lipides) (Lewis 1971) et la majorité des lipides présentes sont neutres (~65% des lipides). Ces lipides peuvent interagir avec les glycoprotéines et affecter leur mouillabilité si ce sont des lipides chargés ou leur hydrophobicité si ce sont des lipides neutres (Bansil and Turner 2018). Cela permet de modifier les propriétés de tension de surface, de lubrification et les propriétés rhéologiques du mucus. Les lipides peuvent également protéger de l'évaporation du mucus, en particulier dans le cas du mucus lacrymal. Dans le mucus respiratoire la teneur en lipides est d'environ 0,1 % (Lewis 1971). Cette concentration augmente fortement en cas de pathologie respiratoire, avec en particulier un enrichissement en phospholipides et glycolipides (Galabert C et al. 1987), ce qui change les propriétés mécaniques du mucus (Galabert C et al. 1987; Sarosiek et al. 1984).

L'ADN. De l'ADN à environ 0,02% est également présent dans le mucus (Potter et al. 1963). En cas de pathologie notamment infectieuse cette concentration peut grandement augmenter jusqu'à plus de 0,4% (Potter et al. 1963) et donc altérer les propriétés mécaniques du mucus.

Les débris cellulaires. Le mucus comporte également des débris cellulaires (Lai et al. 2009a; Thomases 2015; Leal, Smyth, and Ghosh 2017) issus du renouvellement cellulaire des épithéliums mais aussi des pathogènes piégés dans son réseau. Ces débris contribuent à l'hétérogénéité du mucus avec la formation de régions d'agrégats de débris plus ou moins concentrés.

L'épaisseur. L'épaisseur de la couche de mucus peut varier de 2 à 900 μm sur l'épithélium en fonction de l'organe qu'il protège (Leal, Smyth, and Ghosh 2017) (Tableau 2) avec pour le système respiratoire 5 à 15 μm dans les cavités nasales, 10 à 30 μm dans la trachée et 2 à 5 μm dans les bronches. Les épaisseurs les plus élevées se trouvent dans le système digestif avec une grande variation en fonction de l'activité digestive (Leal, Smyth, and Ghosh 2017; Cone 2009).

	Respiratoire	Gastro-intestinal	Cervico-vaginal	Lacrymal
Eau [%]	93-98 [3,4]	~95 [2]	> 90 [7]	~97 [10]
Electrolytes [%]	~1 [3,4]	~1 [1]	~1 [7]	~1 [1]
Lipides [%]	0,1-0,8 [4,5]	1-2 [2]	0,1-2,8 [8]	0,15-0,3 [11]
Protéines [%]	~1,1 [1,4]	2,7-4 [1]	1,5-9 [7]	0,7-2,5 [9]
dont N différentes	186 [1]	145 [1]	147-685 [1]	-
dont glycoprotéines [%]	0,3 [3]	3 [1]	1-6 [7]	0,02-0,07 [9]
dont mucines sécrétées polymérisant	MUC 5B, 5AC, 2 [2]	MUC 5AC, 2, 6 [2]	MUC 5B, 5AC, 2, 6 [2]	MUC 5B, 5AC, 2, 6 [2]
pH	6,5-7,9 [2,6]	1-2 (estomac) [2] 5,5-7,5 (intestins) [2]	5,4-8,2 [2]	7,6-7,8 [2]
Epaisseur [μm]	2-30 [2]	100-900 [2]	~50 [2]	1-10 [2]
Taille des pores du réseau [nm]	10-10000 [2]	< 500 [2]	20-400 [2]	500-600 [2]

Tableau 2: Récapitulatif de la composition du mucus pour différents organes du corps humain. Les références dont sont issu les données, numérotées de 1 à 10, correspondent à : 1 (Bansil and Turner 2018) ; 2 (Leal, Smyth, and Ghosh 2017) ; 3 (Boucher 2019) ; 4 (Potter et al. 1963) ; 5 (Lewis 1971) ; 6 (McShane et al. 2003) ; 7 (Werner 1959) ; 8 (Breckenridge and Pommerenke 1951) ; 9 (Dohlman et al. 1976) ; 10 (Iwata and Kabasawa 1971).

I.1.2. Propriétés des mucines et structure du réseau

Les mucines sont de longues chaînes de glycoprotéines. La glycosylation des protéines est la réaction enzymatique permettant de lier ces protéines à des sucres par liaison covalente. Le taux de glycosylation des mucines peut varier de 50 à 80 % (Bansil and Turner 2018; Dhanisha, Guruvayoorappan, and Abeesh 2018).

La glycosylation présente trois formes différentes : la C-mannosylation, la N-glycosylation, et la O-glycosylation. La C-mannosylation associe des sucres de type mannose au niveau des atomes de carbones des chaînes peptidiques des protéines. La N-glycosylation lie des sucres au niveau des terminaisons $-\text{NH}$ des chaînes peptidiques des protéines et leur confère un enrobage de courtes chaînes de sucres ramifiées. Ces deux types de glycosylation, N et C, se déroulent dans le réticulum endoplasmique rugueux des cellules. La O-glycosylation, très présente sur les mucines, se déroule dans l'appareil de Golgi. Les glucides sont liés au niveau des terminaisons $-\text{OH}$ des acides aminés proline, thréonine et sérine (régions PTS pour l'initiale des 3 acides aminés impliqués) des protéines (Bansil and Turner 2018; Jonckheere, Skrypek, and Frénois 2013; Dhanisha, Guruvayoorappan, and

Abeesh 2018; Corfield 2015; Demouveau et al. 2018; Rose and Voynow 2006) et leur confère un enrobage de longues chaînes de sucre non ramifiées. Cet enrobage possède de grande capacité de rétention d'eau et correspond à 50-90% de la masse finale des mucines (Bansil and Turner 2018; Jonckheere, Skrypek, and Frénois 2013).

Globalement les chaînes de sucres liées aux mucines présentent des terminaisons d'acide sialique et de sulfate ce qui confère une charge négative aux mucines (Rose and Voynow 2006). Cette charge négative des régions de glycosylation permet une répulsion électrostatique entre chaînes (Figure 6B). De plus l'acide sialique sert de récepteur à de nombreuses bactéries et en particulier aux virus ce qui permet au mucus de remplir son rôle de barrière protectrice. Une modification et une altération de la O-glycosylation est souvent observée dans les pathologies respiratoires. Cette altération diminue la capacité des mucines à piéger les bactéries et virus et augmente donc les risques d'infection mais aussi d'inflammation (Rose and Voynow 2006).

Les chaînes de glycoprotéines peuvent se lier entre elles et aux autres composants présents grâce à plusieurs types de liaisons : les liaisons covalentes ; et les liaisons non covalentes subdivisées en quatre catégories : ioniques, hydrophobes, hydrogènes et de Van Der Waals. Les mucines sont fortement liées entre elles par la formation de ponts disulfures, une liaison covalente. Ces ponts se forment sur des régions riches en cystéine, un acide aminé présentant une terminaison sulfhydryde – SH, qui sont présentes de façon répétée le long des chaînes de mucines. On distingue trois types de zones à cystéine : les régions riches en cystéines localisées le long de la chaîne ; des cystéines terminales avec des séquences similaires à celui du facteur Von Willebrand (vWF), un récepteur à collagène et plaquettes permettant l'agrégation cellulaire ; et en terminaison de chaîne, la cystéine dite knot servant à la dimérisation des chaînes (Demouveau et al. 2018; Jonckheere, Skrypek, and Frénois 2013; Corfield 2015) (Figure 6A). Le nombre de régions à cystéine le long des mucines varie en fonction de leur type et permet de créer des réseaux plus ou moins complexes avec des tailles de pores différents (Figure 6A-C). Ces régions à cystéines sont hydrophobes.

On compte 22 mucines différentes chez les mammifères, divisées en deux grandes familles : les mucines sécrétées qui se retrouvent dans le mucus, et les mucines membranaires servant de liaison entre les cellules de l'épithélium (Bansil and Turner 2018; Leal, Smyth, and Ghosh 2017; Dhanisha, Guruvayoorappan, and Abeesh 2018; Jonckheere, Skrypek, and Frénois 2013). Elles ont un poids moléculaire allant de 0,2 à 40 MDa (Leal, Smyth, and Ghosh 2017; Dhanisha, Guruvayoorappan, and Abeesh 2018; Boucher 2019; Rose and Voynow 2006) et une longueur variant de 200 à 10000 nm. Leur rayon de giration est corrélé à la force ionique du milieu (Yakubov et al. 2007).

Dans la famille des mucines sécrétées, on distingue deux sous-groupes : les longues chaînes de mucines formant des gels tels que MUC 2, 5AC, 5B, 6 et 19 ; les mucines à courtes chaînes solubles tels que MUC 7, 8 et 9 (Bansil and Turner 2018; Dhanisha, Guruvayoorappan, and Abeesh 2018; Rose and Voynow 2006). La sous famille des mucines formant des gels est caractérisée par la présence importante de cystéines (Dhanisha, Guruvayoorappan, and Abeesh 2018). Dans le mucus

des voies respiratoires les deux principales mucines présentes formant des gels sont MUC5B et MUC5AC, avec une dominance nette de MUC5B d'un facteur 10 environ (Boucher 2019; Okuda et al. 2019). Cette nette dominance est également présente dans le mucus issu de cultures d'épithélium bronchique (Holmén et al. 2004). MUC5AC est exclusivement produit par les cellules caliciformes tandis que MUC5B est produit également par les glandes sous-muqueuses (Hatstrup and Gendler 2008). Ce sont deux mucines très riches en cystéines (Figure 6A), avec un fort taux de glycosylation et notamment de O-glycosylation, un poids moléculaire de 0,4-0,6 MDa et une longueur supérieure à 4 µm. La mucine MUC2 est insoluble et moins riche en cystéine que MUC5B et MUC5AC. Elle est faiblement présente et rarement mesurable sur les échantillons de mucus respiratoire prélevés (Rose and Voynow 2006), et non présente dans les échantillons provenant de cultures de patients sains (Holmén et al. 2004). En dehors du mucus, des mucines sont également présentes dans la couche péri-ciliaire : MUC16 (2,5-5 MDa), MUC4 (0,9-1,8 MDa) et MUC1 (0,2-0,5 MDa) (Figure 6C) (Hatstrup and Gendler 2008; Dhanisha, Guruvayoorappan, and Abeesh 2018; B. Button, Anderson, and Boucher 2016). Ce sont des mucines de la famille des mucines membranaires formant un réseau dense avec une taille de pores de 20 à 40 nm (B. Button et al. 2012).

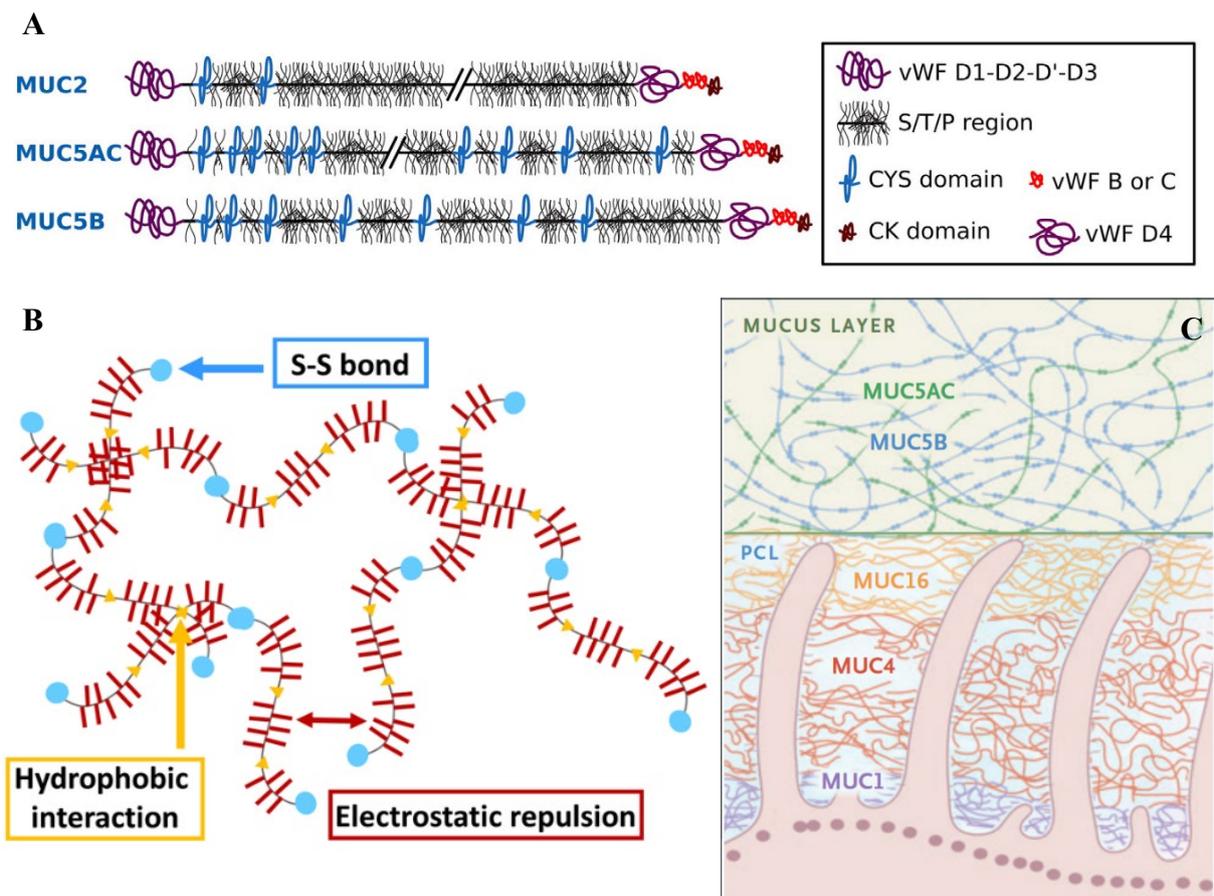


Figure 6 : Schéma des mucines présentes dans le système respiratoire et du réseau qu'elles forment. A) Structure des mucines sécrétées formant un gel. « CYS » : cystéine (figuré bleu) ; « vWF » : cystéine terminale avec des séquences similaires à celui du facteur Von Willebrand (figurés violets et rouges) ; « CK domain » : cystéine terminale knot (figuré marron) ; « S/T/P region » : O-glycosylation (figuré noir en peigne). Figure d'après Demouveau et al 2017. B) Schéma du réseau

de mucines. Les zones figurées avec des tirés rouges comme des peignes représentent les régions de O-glycosylation négativement chargées, les zones bleus les régions de cystéines terminales et les zones jaunes les régions de cystéines dans la chaîne. Schéma d'après Wagner et al 2017. C) Schéma des mucines présentes sur l'épithélium et du réseau qu'elles forment, en tenant compte des deux couches : la zone péri-ciliaire (PCL) et le mucus. Figure d'après Bucher 2019.

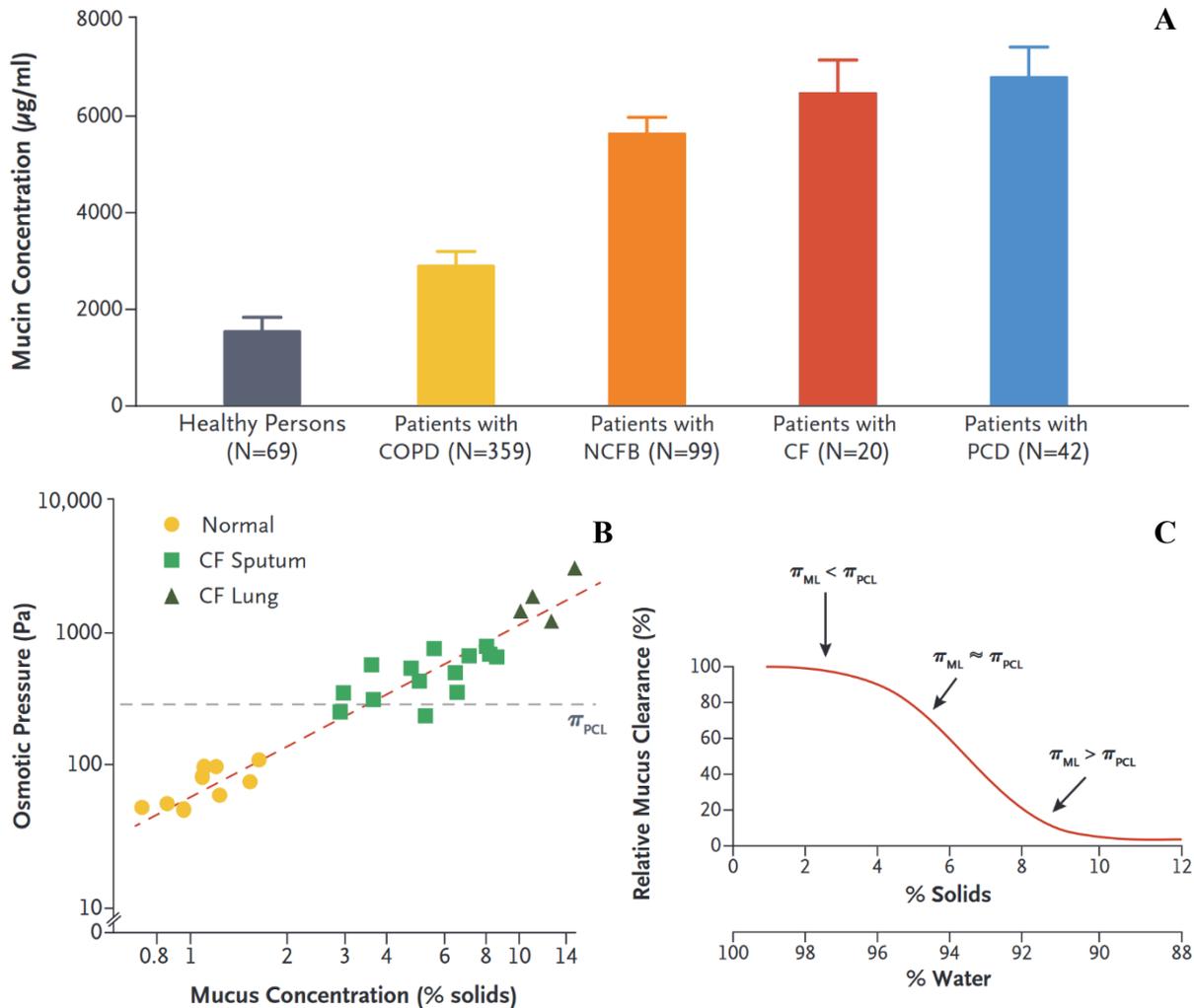


Figure 7 : Concentration du mucus respiratoire pour différentes pathologies et son impact sur la fonction mucociliaire. A) Concentration en mucines dans des expectorations induites : de personnes saines (Healthy Persons, barre grise) et de patients atteints respectivement : de BPCO (COPD, barre jaune), de dilatation des bronches (NCFB, barre orange), de mucoviscidose (CF, barre rouge) et de dyskinésie ciliaire primaire (PCD, barre bleu). B) Relation entre la concentration en masse solide du mucus et sa pression osmotique. La pression osmotique de la PCL (notée π_{PCL}) est indiquée par la ligne pointillée. C) Efficacité du nettoyage mucociliaire relative à l'efficacité normale (personnes saines, concentration du mucus de 2% en masse sèche) en fonction de la concentration du mucus. L'évolution du rapport des pressions osmotiques entre celle de la couche de mucus notée π_{ML} et celle de la PCL notée π_{PCL} est indiquée par les flèches noires. L'arrêt du transport muco-ciliaire correspond à des pressions osmotiques du mucus supérieures à 600 Pa. Figures d'après Boucher 2019.

Les différentes liaisons, covalentes, hydrogènes, hydrophobes et ioniques, entre chaînes de mucines et avec les autres composants du mucus, tels que les autres protéines (Radicioni et al. 2016), les lipides, ou encore l'ADN, forment un réseau complexe et hétérogène. C'est ce réseau qui donne au mucus ses propriétés viscoélastiques particulières. D'où l'importance de la concentration des autres composants du mucus et pas seulement de celle en mucines. La formation de liaisons hydrogènes et ioniques, notamment, expliquent la sensibilité du mucus à la concentration ionique et au pH. En plus des propriétés rhéologiques du mucus, le taux de glycosylation des mucines lui confère des propriétés adhésives essentielles, notamment contre la pénétration de pathogènes tels que les bactéries et virus. Ainsi la taille des pores du réseau formé joue un rôle de barrière sélective par la taille des pathogènes, particules et molécules pénétrant le mucus, laissant ainsi passer les petites molécules nutritives, tandis que la glycosylation des mucines permet d'adhérer et piéger même les plus petits pathogènes tel les virus et petites bactéries indépendamment de leur taille (Lieleg and Ribbeck 2011).

Les caractéristiques viscoélastiques et adhésives du réseau de mucines sont régulées en continu par la modification et l'adaptation de la composition du mucus sécrété. La composition du mucus affecte également la pression osmotique de la couche de mucus et son rapport avec celle relativement constante à 300 Pa de la couche péri-ciliaire (PCL) en dessous, comme le montre la Figure 7B. Ce rapport de pression osmotique régule l'épaisseur de la PCL qui est nécessaire au maintien du battement des cellules ciliées. En effet, au-dessus d'une pression osmotique de 600 Pa de la couche de mucus, la PCL atteint une réduction critique entraînant l'arrêt du battement ciliaire et du transport du mucus (Figure 7C) avec les cils qui s'effondrent sur le tissu (B. Button et al. 2012). Cette régulation de la composition du mucus est donc vitale pour l'efficacité de la fonction muco-ciliaire. Des dysfonctions peuvent entraîner des pathologies chroniques, des infections et inflammations aux conséquences graves (Figure 7A-C). Bien comprendre les propriétés des mucines et la régulation de la composition du mucus sécrété sont donc des enjeux scientifiques et médicaux majeurs explorés ces dernières années (S. Lee et al. 2005; Bansil and Turner 2006; Yakubov et al. 2007; Lieleg and Ribbeck 2011; Jonckheere, Skrypek, and Frénois 2013; Corfield 2015; Radicioni et al. 2016; Wagner et al. 2017; Demouveau et al. 2018; Dhanisha, Guruvayoorappan, and Abeesh 2018).

I.1.3. Rhéologie du mucus

Les propriétés rhéologiques du mucus, et en particulier celles viscoélastiques qui seront présentées ici, sont très liées à sa composition et au réseau formé par les mucines.

Deux approches sont souvent utilisées pour étudier la rhéologie du mucus, correspondant à deux échelles spatiales d'observation : la macro-rhéologie et la micro-rhéologie. Elles ont chacune leurs avantages et inconvénients. La macro-rhéologie permet d'avoir le comportement global du

fluide. Cette approche est adaptée aux fluides homogènes. Sur le mucus, elle est menée principalement en rhéologie de cisaillement afin de reproduire les pressions de cisaillement qu'il subit sous l'action du battement ciliaire (de l'ordre de 100 Pa) et du flux d'air (0,05 Pa (Fredberg 1978; B. M. Button and Button 2013) à 170 Pa pour la toux (Jones et al. 1975; B. M. Button and Button 2013)). La rhéologie en extension est privilégiée pour les mesures de force d'adhésion qui seront discutées dans la partie suivante (I.1.4.). La micro-rhéologie est idéale pour sonder la réponse locale et évaluer l'hétérogénéité. Elle est donc très utile dans l'étude de fluides biologiques comme le mucus, souvent hétérogènes. De plus elle permet de travailler avec de très faibles volumes de l'ordre de 10 μ L ce qui est souvent le cas avec du matériel biologique difficilement récoltable en grande quantité. La micro-rhéologie peut être passive, basée sur l'étude du mouvement brownien, ou active avec l'utilisation de pincettes optiques ou de pincettes magnétiques. La partie méthode (I.2.2.) présentera de manière plus détaillée les principes de la rhéologie et les outils employés.

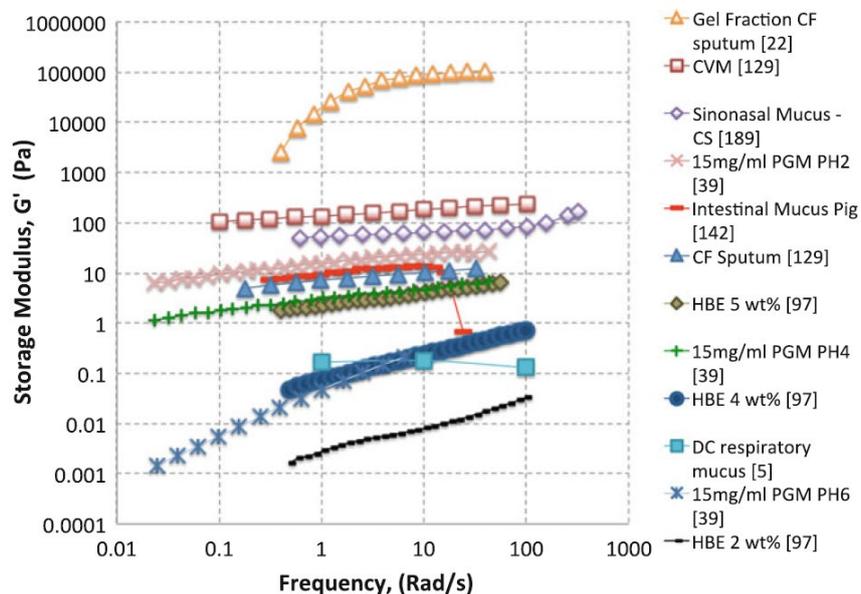


Figure 8 : Illustration de la diversité des valeurs du module élastique G' en fonction de la fréquence pour différents types de mucus et de composition. Dans la légende les sigles signifient respectivement : HBE « human bronchial epithelium », PGM « pig gastrointestinal mucus », CVM « cervicovaginal mucus », CF « cystic fibrosis » pour la pathologie de la mucoviscidose, CS « chronic sinusitis » et DC « direct collection ». Les « sputum » sont des expectorations donc du mucus respiratoire. Figure d'après le livre de Spagnolie 2015 (Thomas 2015).

Propriétés macro-rhéologiques du mucus

La diversité des origines du mucus analysé (organes, animaux) et de leurs méthodes de prélèvement ou de préparation (mucus reconstitué), donnent des résultats de viscoélasticité très différents, dispersés sur plus de 8 ordres de grandeur (de 10^{-3} à 10^5 Pa), comme l'illustre la Figure 8. De plus, la forte hétérogénéité du mucus, en particulier celui respiratoire, peut donner des valeurs très différentes entre les deux échelles macro- et microscopique, et l'origine du prélèvement (expectoration, prélèvement in vivo, cultures d'épithélium). Néanmoins, le comportement

rhéologique global du mucus est similaire quel que soit son origine. Il se caractérise par un comportement fortement rhéo-fluidifiant en macro-rhéologie continue, c'est-à-dire que la viscosité décroît fortement avec l'augmentation du taux de cisaillement. L'exposant de la loi de puissance de la viscosité en fonction du taux de cisaillement est très proche de -1, autour de -0,9 en moyenne (Figure 9) (E. S. Vasquez et al. 2014; Celli et al. 2007b; Lai et al. 2009b). Il possède un seuil d'écoulement, particulièrement net dans le cas du mucus d'escargot (Ewoldt et al. 2007), mais difficilement détectable dans d'autres type de mucus car beaucoup plus faible. C'est également un fluide viscoélastique de type gel avec un module élastique G' supérieur au module visqueux G'' . La variation de G' en fonction de la fréquence forme un plateau, avec un exposant de la loi de puissance entre 0 et 0,3 et il n'y a pas de croisement de G' et G'' en fonction de la fréquence entre 10^{-2} et 10^2 Hz (Figure 11 et Figure 12), donc pas de temps caractéristique pour le mucus (E. S. Vasquez et al. 2014; Kirch et al. 2012; Celli et al. 2007a; Philippe, Cipelletti, and Larobina 2017; Gross et al. 2017; Schuster et al. 2013; Ewoldt et al. 2007). Le mucus se distingue également d'autres solutions de polymères aux propriétés viscoélastiques similaires par une signature en régime non-linéaire, c'est-à-dire pour de grandes amplitudes de déformations, marquée par un comportement rhéo-solidifiant (Figure 10). La contribution non-linéaire du module élastique augmente avec la déformation appliquée. Les ellipses de Lissajous (contrainte en fonction de la déformation sur un cycle d'oscillation) observées présente également des extrémités très déformées. Cela a été observé sur du mucus d'escargot (Ewoldt et al. 2007) mais également sur du mucus respiratoire de cheval (Gross et al. 2017; E. S. Vasquez et al. 2014). Une dernière caractéristique propre au mucus à souligner est la différence de comportement rhéologique entre l'échelle macroscopique et microscopique qui va être discuté ci-dessous.

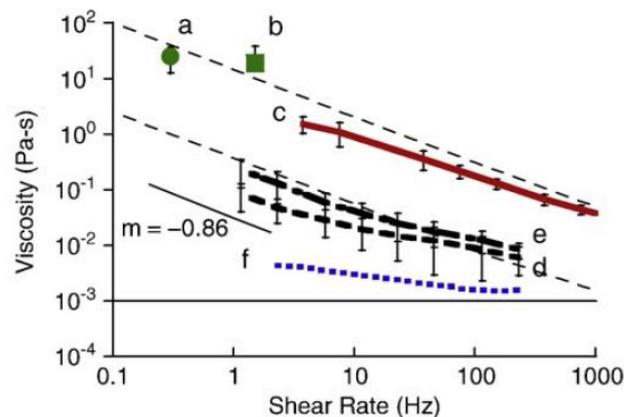


Figure 9 : Propriétés visqueuses du mucus. Le graphe montre la viscosité en fonction du taux de cisaillement pour plusieurs types de mucus : respiratoire sain (zone encadrée par les deux fines lignes noires en pointillées), nasal de patients atteints de sinusite chronique (ronds et carrés verts), cervico-vaginal hors période ovulatoire (ligne pleine rouge), gastrique (ligne noire à tirets longs), intestinal (ligne noire à tirets courts), et lacrymal (ligne en pointillés bleus). Les mesures sont effectuées en macro-rhéologie ou micro-rhéologie en fonction des échantillons. La fine ligne pleine noire à 10^{-3} Pa.s indique la valeur de l'eau. Figure d'après Lai et al 2009.

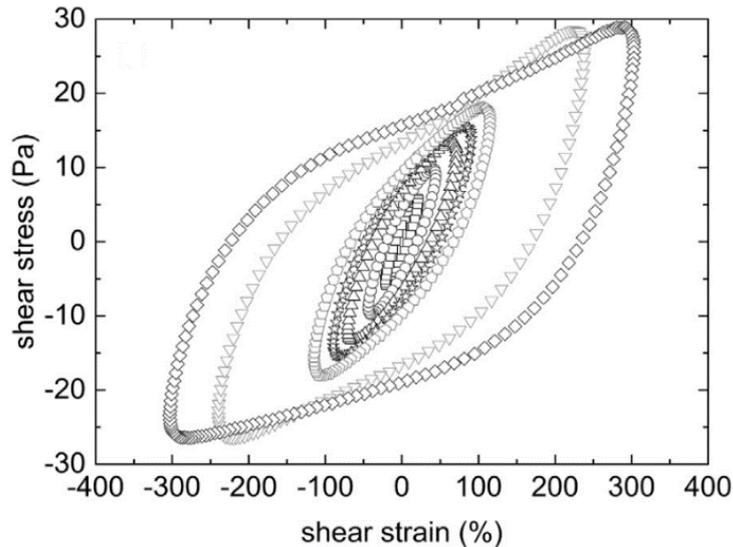


Figure 10 : Comportement en macro-rhéologie non linéaire du mucus. Sur un cycle d'oscillation la contrainte est représentée en fonction de la déformation. Les différents symboles et donc ellipses représentent différentes mesures avec une déformation oscillatoire imposée différente. Le mucus provient de bronches de cheval prélevé par bronchoscopie. Figure d'après Gross et al 2017.

Impact de la composition du mucus sur sa rhéologie

Comme discuté plus haut, la composition du mucus, et notamment sa concentration en glycoprotéines, joue un rôle important sur ses propriétés viscoélastiques. L'article de Hill et al 2014 (Hill et al. 2014) montre la forte dépendance de la viscoélasticité du mucus avec sa concentration (Figure 11). Entre une concentration en masse sèche de 1,5% à 5% les modules de viscoélasticité gagnent 4 ordres de grandeur et on observe une transition, autour d'une concentration de 4%, d'un mucus dominé par la viscosité vers un mucus gel dominé par l'élasticité. L'étude a été menée sur du mucus prélevé sur des cultures d'épithélium bronchique, concentré par absorption de l'eau sous dialyse dans du PBS afin de maintenir un mucus isotonique. Les valeurs des modules élastique G' et visqueux G'' sont obtenues en micro-rhéologie passive avec l'analyse du mouvement Brownien de microbilles de polystyrène carboxylées (terminaison COOH^-) de $1 \mu\text{m}$ de diamètre.

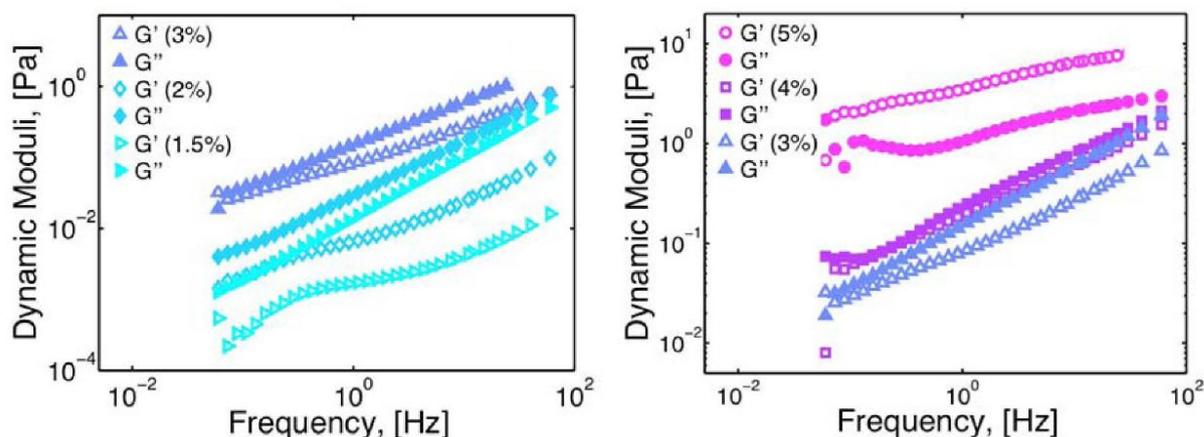


Figure 11 : Evolution de la viscoélasticité du mucus avec sa concentration. Les valeurs du module élastique G' (figurés vides) et du module visqueux G'' (figurés pleins) sont représentées en fonction de la fréquence. Elles sont obtenues en micro-rhéologie passive avec des microbilles de $1\ \mu\text{m}$. Les couleurs représentent les différentes concentrations qui correspondent au pourcentage massique de la masse sèche du mucus variant de 1,5% (turquoise) à 5% (rose). Le mucus est issu de prélèvement sur des cultures d'épithélium bronchique humain. Figure d'après Hill et al 2014.

Le pH et la concentration en électrolytes sont également des paramètres importants pour les propriétés viscoélastiques du mucus pour une même teneur en protéines. Ces observations ont été menées essentiellement sur du mucus gastro-intestinal, purifié et reconstitué à partir de prélèvements porcins, contenant exclusivement un type de mucine, MUC5AC ou MUC6 (Celli et al. 2007b; S. Lee et al. 2005; Yakubov et al. 2007; Wagner et al. 2017). Une diminution de la viscoélasticité avec une transition de phase gel à solution est observée lorsque le pH ou la concentration en électrolytes augmentent (Figure 12). Ces modifications de la viscoélasticité peuvent s'expliquer par la modification de la conformation des mucines, notamment leur rayon de giration, comme mesuré par Yakubov et al 2007 (Yakubov et al. 2007) par analyse de la diffusion de la lumière statique (SLD « static light scattering ») ou dynamique (DLS « dynamic light scattering »). Ils montrent la diminution du rayon de giration avec l'élévation de la température mais également avec l'augmentation de la concentration en mucines et de la force ionique du milieu (Figure 13). Le pH a un effet important sur l'augmentation du rayon de giration pour les valeurs extrêmes ($\text{pH} < 4$ et $\text{pH} > 9$) mais négligeable sur une large gamme entre 4 et 9 (Figure 13D). Néanmoins ces résultats sont à nuancer car l'impact du pH, de la force ionique ou de la température, sur la rhéologie, est nettement moins marqué sur du mucus natif (Y. Y. Wang et al. 2013).

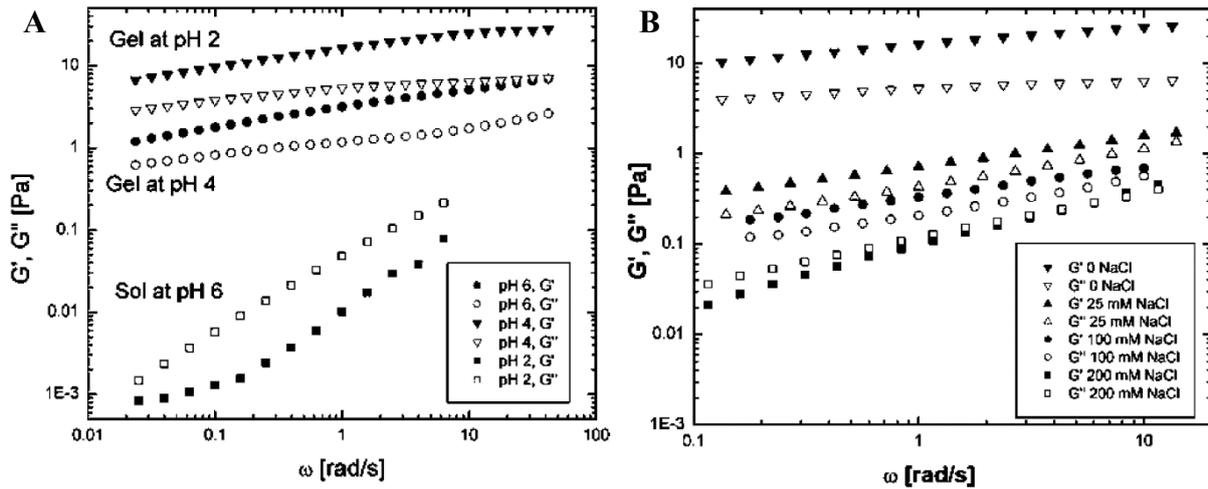


Figure 12 : Influence du pH et de la concentration en électrolytes sur la viscoélasticité du mucus. Le module élastique G' (symboles pleins) et le module visqueux (symboles vides) sont représentés en fonction de la fréquence angulaire pour : A) trois valeurs de pH (pH 2 : triangles, pH 4 : disques, pH 6 : carrés) ; B) différentes forces ioniques (concentrations en NaCl) à pH 2. Les valeurs ont été obtenues en macro-rhéologie sur du mucus gastro-intestinal de cochon reconstitué à partir de mucines commerciales. Figures d'après Celli et al 2007.

Différences entre macro- et micro-rhéologie du mucus

Le mucus est un fluide complexe et hétérogène composé de plusieurs types de protéines et mucines. Etudier son comportement rhéologique à plusieurs échelles peut permettre de mieux comprendre sa structure. Pour ceux qui ont fait la comparaison sur le même matériel entre les valeurs de macro-rhéologie et micro-rhéologie, il apparaît qu'il n'y a aucune différence entre les deux échelles sur mucus gastro-intestinal reconstitué (Yakubov et al. 2007). Cela semble dû au fait que pour les mucines commerciales, la mucine est purifiée et ne conserve qu'un type de mucine. Sur du mucus intestinal issu de prélèvement (autopsie de cochons) (Bokkasam et al. 2016) une légère différence est observée d'un facteur 3 environ entre les valeurs de micro-rhéologie et de macro-rhéologie ($G'_{\text{micro}} \sim 45$ Pa et $G'_{\text{macro}} \sim 150$ Pa) mais avec toujours $G' > G''$. Une autre étude sur le mucus gastrique, prélevé sur du cochon, montre également une dynamique différente entre la réponse en macro-rhéologie et la réponse à l'échelle microscopique en diffusion de lumière (Philippe, Cipelletti, and Larobina 2017). L'échelle microscopique montre une réorganisation continue du réseau sous la déformation, cohérente avec la fonction du mucus et sa nécessité de s'adapter en permanence aux sollicitations et agressions. Cette différence se retrouve aussi dans le mucus de vers marin avec une différence d'un facteur 5 entre le $G'_{\text{micro}} (\sim 0,3$ Pa) et le $G'_{\text{macro}} (\sim 1,5$ Pa) (Weigand et al. 2017). Sur le mucus bronchique, la différence entre les deux échelles est considérable, supérieure à un facteur 100, avec $G'_{\text{micro}} \sim 30$ Pa et $G'_{\text{macro}} \sim 4500$ Pa (Bokkasam et al. 2016). De plus on a une inversion du comportement avec $G'_{\text{micro}} < G''_{\text{micro}}$, donc un mucus à dominance visqueuse à l'échelle microscopique, et $G'_{\text{macro}} > G''_{\text{macro}}$, donc un mucus à dominance élastique à l'échelle macroscopique. Cette différence du comportement rhéologique entre les deux échelles est donc

typique du mucus et particulièrement importante dans celui respiratoire. Elle a également été observé sur du mucus bronchique de cheval dans les mêmes ordres de grandeur mais avec le module élastique G' toujours supérieur au module visqueux G'' (Figure 14) (Gross et al. 2017).

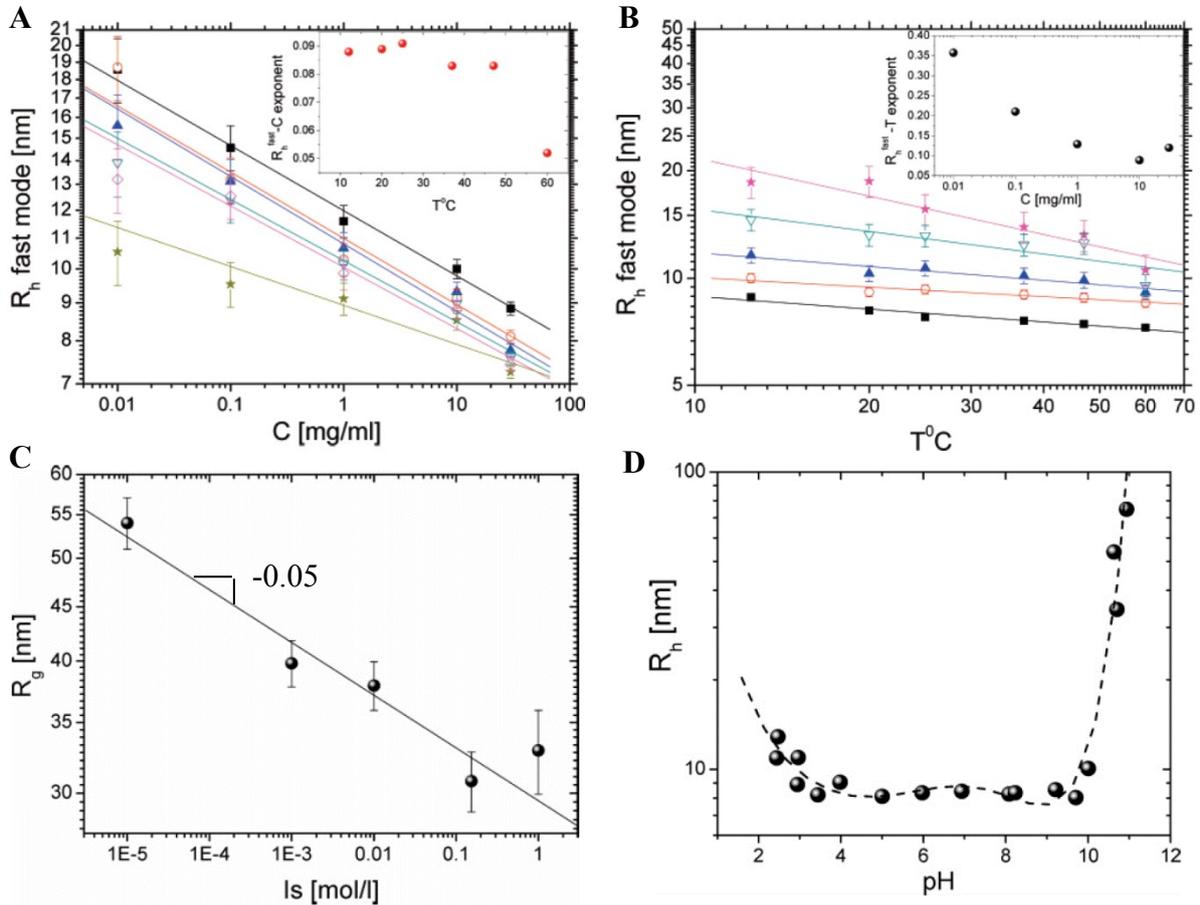


Figure 13 : Evolution du rayon de giration R_g ou du rayon hydrodynamique R_h des mucines en fonction de A) la concentration C en mucines, B) la température T , C) la force ionique I_s et D) le pH. R_h est mesuré en DLS (panneaux A, B, D) et R_g est mesuré en SLS (panneau C). A) R_h en fonction de C pour différentes conditions de température T : 12,5°C (carrés noirs), 20°C (cercles orange), 25°C (triangles vers le haut bleus), 37°C (triangles vers le bas verts), 47°C (losanges roses) et 60°C (étoiles vert kaki). En insertion est représentée l'exposant de la loi de puissance du fit des courbes $R_h(C)$ en fonction de la température T . B) R_h est mesuré en fonction de T pour différentes concentrations C en mucines : 30 mg/mL (carrés noirs), 10 mg/mL (cercles orange), 1 mg/mL (triangles vers le haut bleus), 0,1 mg/mL (triangles vers le bas verts) et 0,01 mg/mL (étoiles roses). En insertion est représentée l'exposant de la loi de puissance du fit des courbes $R_h(T)$ en fonction de la concentration C . C) et D) sont mesurés pour un mucus à $C=30$ mg/mL et $T=25$ °C. Le mucus étudié est d'origine stomacal, de porc, reconstitué à partir de mucines commerciales (contient exclusivement du MUC6). Figures d'après Yakubov et al 2007.

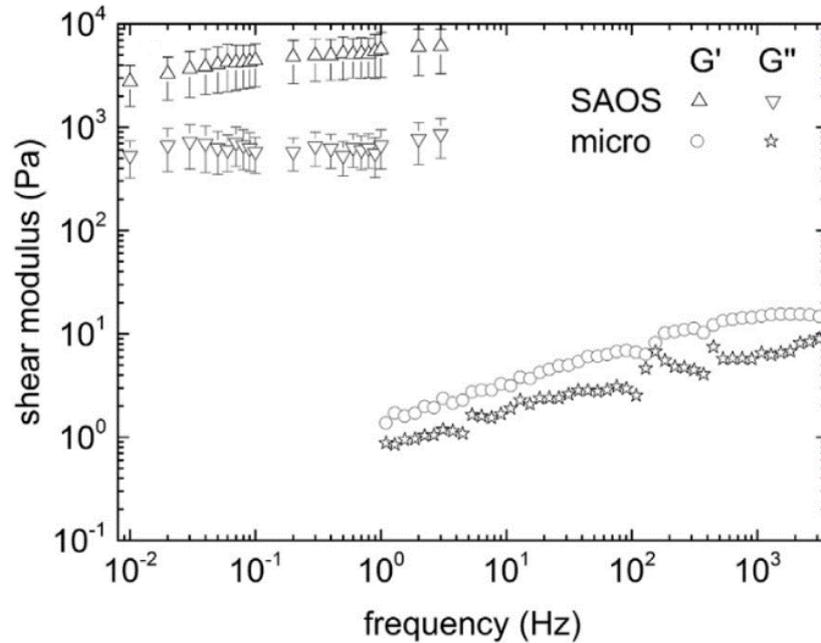


Figure 14 : Différence entre les valeurs de micro-rhéologie et de macro-rhéologie sur le mucus respiratoire. Les modules élastiques G' et visqueux G'' sont mesurés en fonction de la fréquence : en macro-rhéologie de cisaillement « SAOS » ; et en micro-rhéologie passive, dans un piège optique, « micro ». Le mucus provient de bronches de cheval prélevé par bronchoscopie. Figure d'après Gross et al 2017.

Le mucus bronchique

Dans le cas du mucus bronchique sain, il faut bien distinguer les échantillons provenant de culture dont la composition est définie plus haut dans le Tableau 2, avec une masse sèche de $2 \pm 0,5$ % (Hill et al. 2014), et ceux provenant de prélèvements effectués dans les bronches (*in vivo* ou lors d'autopsies), avec une masse sèche pouvant varier de 2 à 7 % selon les échantillons (E. S. Vasquez et al. 2014; Schuster et al. 2013). Cette large dispersion peut être due, entre autres, à la présence plus ou moins importante de débris cellulaire dans le mucus. La production du mucus et sa répartition sur l'épithélium étant hétérogène, un biais peut être introduit dans le cas du mucus *in vivo*, dû à la zone du prélèvement (proche des zones glandulaires ou dans des zones d'amas du mucus) et la stimulation possible de la production de mucus à cause de l'agression du tissu provoquée par la méthode de prélèvement. Il y a également les échantillons de mucus respiratoire provenant d'expectorations, dont la masse sèche pour un patient sain peut varier de 1,1 à 2,3 % (Hill et al. 2014; B. Button, Anderson, and Boucher 2016). Les données issues d'expectorations (Serisier et al. 2009; Yuan et al. 2015) doivent être prises avec précaution car elles sont souvent contaminées par de la salive. Dans le cas des expectorations dites induites, ce qui est toujours le cas pour des patients sains, il y a également le risque de dilution du mucus par la solution inhalée pour déclencher l'expectoration. Le Tableau 3 résume les différentes valeurs de viscoélasticité obtenues sur du mucus respiratoire en fonction de son origine.

	Ex vivo	Expectorations	HBE cultures
G'_{macro} [Pa]	$5 \cdot 10^0 - 3 \cdot 10^1$ [1] $3 - 8 \cdot 10^3$ [2,4]	$2 \cdot 10^{-2} - 2 \cdot 10^0$ [8,9]	$\sim 1 \cdot 10^0$ [6]
G'_{micro} [Pa]	$2 \cdot 10^{-1} - 3 \cdot 10^0$ [2,3] $1 \cdot 10^0 - 1 \cdot 10^1$ [4,5]	–	$1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-2}$ [7]
G''_{macro} [Pa]	$1 \cdot 10^0 - 6 \cdot 10^0$ [1] $3 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^3$ [2] $2 - 5 \cdot 10^3$ [4]	$8 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^0$ [8,9]	$5 - 7 \cdot 10^{-1}$ [6]
G''_{micro} [Pa]	$2 \cdot 10^{-1} - 3 \cdot 10^0$ [2,3,5]	–	$1 - 2 \cdot 10^{-2}$ [7]
η_{macro} [Pa-s]	$6 \cdot 10^{-1} - 2 \cdot 10^0$ [1]	$4 \cdot 10^{-2} - 5 \cdot 10^{-1}$ [8]	$1 - 2 \cdot 10^{-1}$ [6]
η_{micro} [Pa-s]	–	–	$2 - 5 \cdot 10^{-2}$ [7]

Tableau 3 : Résumé des valeurs de viscoélasticité du mucus respiratoire sain en fonction de son origine. Les valeurs du module élastique G' , du module visqueux G'' et de la viscosité η sont indiquées pour la macro-rhéologie (lignes grisées) et la micro-rhéologie (lignes blanches) pour une valeur de fréquence proche de 1 Hz. « Ex vivo » réfère aux prélèvements de mucus dans les bronches ou la trachée in vivo où prélevé lors d'autopsies sur des mammifères. Les références 1 (E. S. Vasquez et al. 2014), 2 (Gross et al. 2017) et 3 (Kirch et al. 2012) rapportent des expériences avec du mucus bronchique de cheval avec une masse sèche de $2,2 \pm 0,2$ % pour la référence 1. La référence 4 (Bokkasam et al. 2016) utilise du mucus de trachée de cochon avec une masse sèche non connue. La référence 5 (Schuster et al. 2013) utilise du mucus de trachée humaine d'une masse sèche de $6,9 \pm 2,8$ %. Les expectorations, références 8 (Serisier et al. 2009) et 9 (Yuan et al. 2015), sont des expectorations induites pour des patients sains et leur masse sèche est inconnue. « HBE cultures » réfère au mucus prélevé sur des cultures d'épithélium bronchique humain. Pour la référence 6 (P. A. Vasquez et al. 2016) la masse sèche est de 2,5 % et pour la référence 7 (Hill et al. 2014) les valeurs correspondent à une gamme de masse sèche entre 1,5 et 3 %.

Hétérogénéité et structure du mucus

Pour expliquer ces caractéristiques particulières du mucus, notamment celui respiratoire, quelques modèles de structure ont été proposés, appuyés sur des observations du réseau et de son hétérogénéité par cryo-microscopie électronique à balayage (Kirch et al. 2012; Weigand et al. 2017; Philippe, Cipelletti, and Larobina 2017; Gross et al. 2017). Kirch et al. 2012 proposent une structure poreuse aux parois solides (élastiques), Philippe et al. 2017 suggèrent un fluide à séparation de phase arrêtée, et Weigand et al. 2017 proposent un couplage de deux réseaux de taille de pores différente, illustré en *Figure 15B*. Ces trois modèles peuvent se rejoindre dans celui avancé par Gross et al. 2017 d'un réseau poreux à paroi élastique dont les pores peuvent être remplis d'une solution aqueuse à faible viscoélasticité. Ainsi la macro-rhéologie permet d'analyser les propriétés du réseau à larges pores aux parois élastiques tandis que la micro-rhéologie sonde la solution aqueuse dans les pores. Ce modèle est cohérent avec le fait que chaque type de mucus comporte au minimum deux types de mucines différentes qui peuvent donc former des réseaux différents.

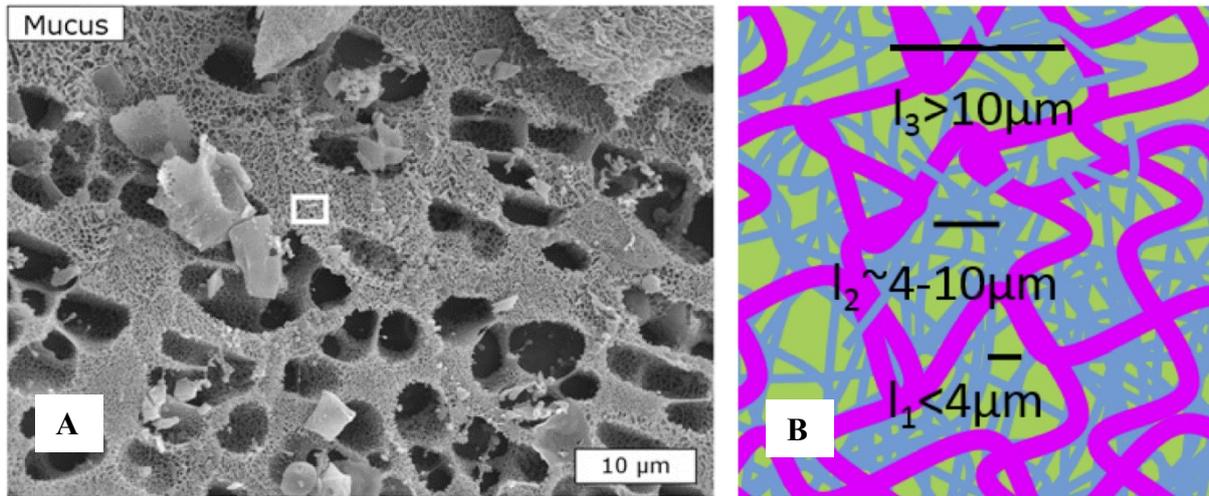


Figure 15 : Structure et hétérogénéité du mucus. A) Illustration de la structure complexe et hétérogène du mucus avec des tailles de pores variant de 0,2 à 10 μm . L'image a été prise par cryo-microscopie électronique à balayage sur du mucus bronchique prélevé sur des chevaux. Figure d'après Kirch et al 2012. B) Modèle de structure proposé par Weigand et al 2017 d'un couplage de deux réseaux de taille de pores différente.

Globalement le mucus peut être décrit comme un fluide complexe, hétérogène (Kirch et al. 2012; Weigand et al. 2017; Philippe, Cipelletti, and Larobina 2017; Gross et al. 2017; Bokkasam et al. 2016; E. S. Vasquez et al. 2014) et viscoélastique. A l'échelle macroscopique, il a un comportement à dominance élastique sans temps caractéristiques, un écoulement fortement rhéofluidifiant (E. S. Vasquez et al. 2014; Gross et al. 2017; Lai et al. 2009b) pouvant présenter des propriétés de fluide à seuil, et également un régime non linéaire marqué par l'augmentation du module élastique (« strain-stiffening ») avec une déformation des pointes des ellipses de Lissajous au-delà de 100% de déformation (Ewoldt et al. 2007; Gross et al. 2017). A l'échelle microscopique en revanche, le mucus a un comportement à dominance visqueuse, type liquide (Hill et al. 2014) avec des valeurs des modules viscoélastiques trois ordres de grandeur plus basses qu'en macro-rhéologie. La Figure 16 résume les propriétés rhéologiques du mucus.

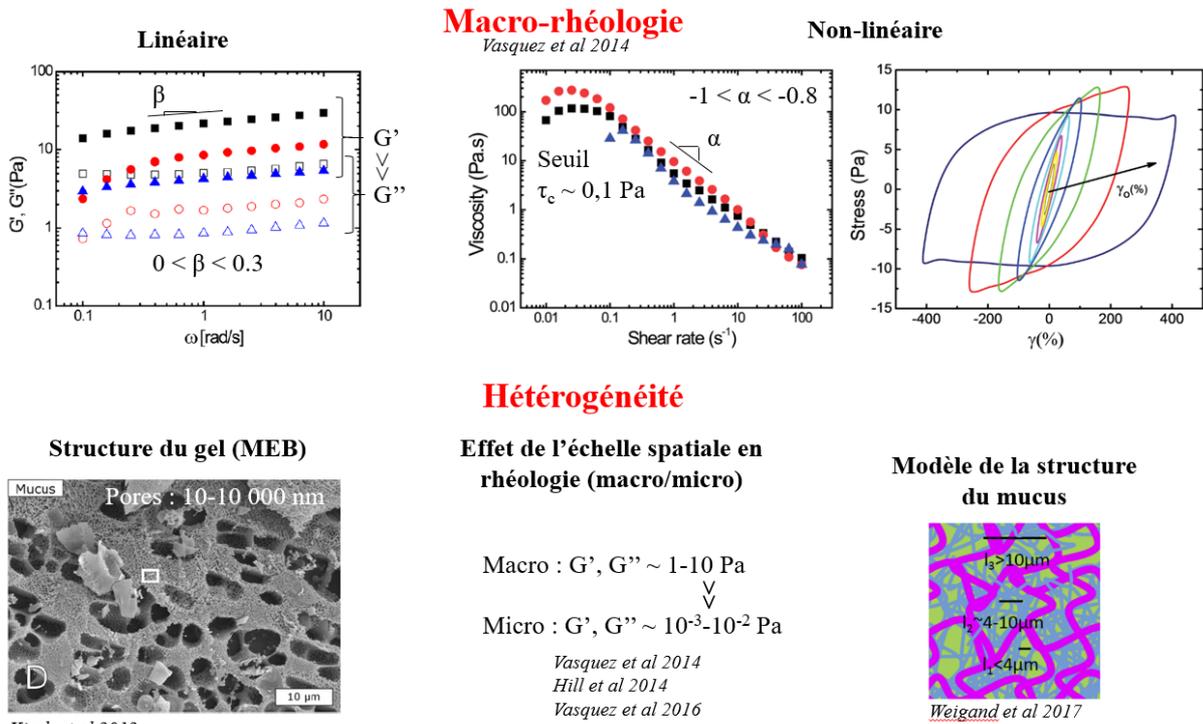


Figure 16 : Synthèse graphique des principales caractéristiques rhéologiques du mucus. Rhéologie à l'échelle macroscopique (figures d'après Vasquez et al 2014) et à l'échelle microscopique (valeurs d'après Hill et al., 2014), et image du réseau (cryo-microscopie électronique à balayage, d'après Kirch et al 2012) avec un schéma interprétatif de la structure du mucus comme un couplage de deux réseaux aux propriétés différentes (Weigand et al 2017).

I.1.4. Propriétés adhésives du mucus

L'adhésion est une autre propriété mécanique importante du mucus qui doit être suffisante pour piéger les pathogènes et les microparticules, mais aussi l'eau, tout en permettant le transport du mucus par les cils et la toux.

Tout comme pour les propriétés viscoélastiques, l'adhésion dépend de la composition du mucus et notamment de son taux d'hydratation (Girod et al. 1992). L'adhésion est définie comme la force qu'il faut appliquer par unité de surface, en extension, pour décrocher le mucus d'une surface. La Figure 17 montre l'évolution de l'adhésion d'expectoration de patients atteints de mucoviscidose en fonction de la concentration solide et l'impact sur le taux de transport du mucus mesuré par vidéo-microscopie sur un épithélium cilié de palais de grenouille.

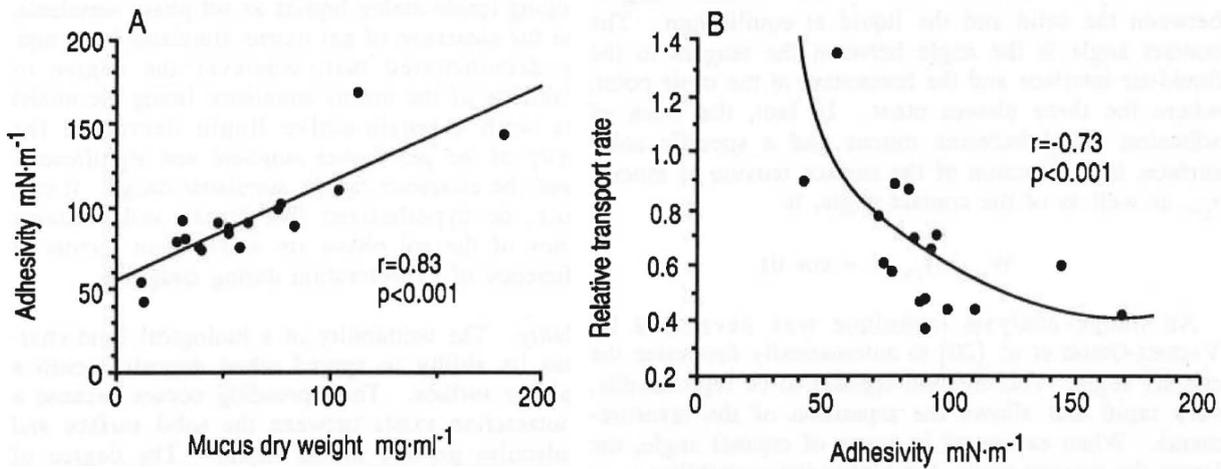


Figure 17 : Impact de la concentration du mucus sur son adhésion et son taux de transport. Les échantillons de mucus, au nombre de 17, sont des expectorations spontanées de patients atteints de mucoviscidose. A) Adhésion du mucus en fonction de sa teneur en masse sèche. B) Taux de transport relatif du mucus en fonction de son adhésion. Le transport est obtenu en plaçant une goutte d'échantillon sur un épithélium cilié de palais de grenouille. Il est exprimé relativement à celui du mucus natif du palais de grenouille. Les valeurs r et p indiquées sur les graphes, réfèrent à la qualité de l'ajustement appliqué (linéaire pour le panneau A) et exponentiel pour le panneau B)). Figures d'après Girod et al., 1992.

L'adhésion du mucus, c'est à dire la force qu'il faut appliquer par unité de surface pour décoller le gel, est à distinguer de la cohésion, qui représente la force qu'il faut exercer pour rompre le mucus. Une étude (B. Button et al. 2018) illustre la différence entre ces deux phénomènes et montre l'impact de la vitesse de traction et de la concentration du mucus sur ces variables (Figure 18). L'adhésion est mesurée directement sur l'épithélium, issu de cultures ALI, grâce à une grille en cellulose de $0,3 \times 0,7 \text{ mm}^2$ découpée au laser et munie d'une tige verticale posée préalablement sur la couche de mucus. Après 12 à 16h d'incubation du tissu avec la grille, l'expérience est réalisée en tirant sur la tige reliée à un capteur de force, dans un espace saturé à plus de 80 % d'humidité afin d'éviter l'évaporation du mucus en cours de mesure. Pour la mesure de cohésion, le principe de l'expérience est le même, mais elle est réalisée sur du mucus prélevé de la culture qui est ensuite placé entre deux grilles de cellulose. L'une à la base, de $0,7 \times 18 \text{ mm}^2$, est fixée à une plaque de verre ; et l'autre en haut, de $0,5 \times 15 \text{ mm}^2$, est reliée à un capteur de force. Pour les deux expériences la concentration du mucus reportée est la masse sèche, mesurée avant chaque expérience. Elle est modulée en rinçant plus ou moins fréquemment et abondamment la culture au PBS, une solution tampon neutre, pendant les jours précédant l'expérience. Ces expériences montrent que l'adhésion et la cohésion du mucus augmentent fortement avec la vitesse de traction et que cette augmentation est d'autant plus importante lorsque le mucus est plus concentré. La plus basse des vitesses imposées, de $10 \mu\text{m/s}$, correspond à l'ordre de grandeur de la vitesse du cil pendant sa poussée (fréquence $\sim 10 \text{ Hz}$ et longueur du cil $\sim 7 \mu\text{m}$)

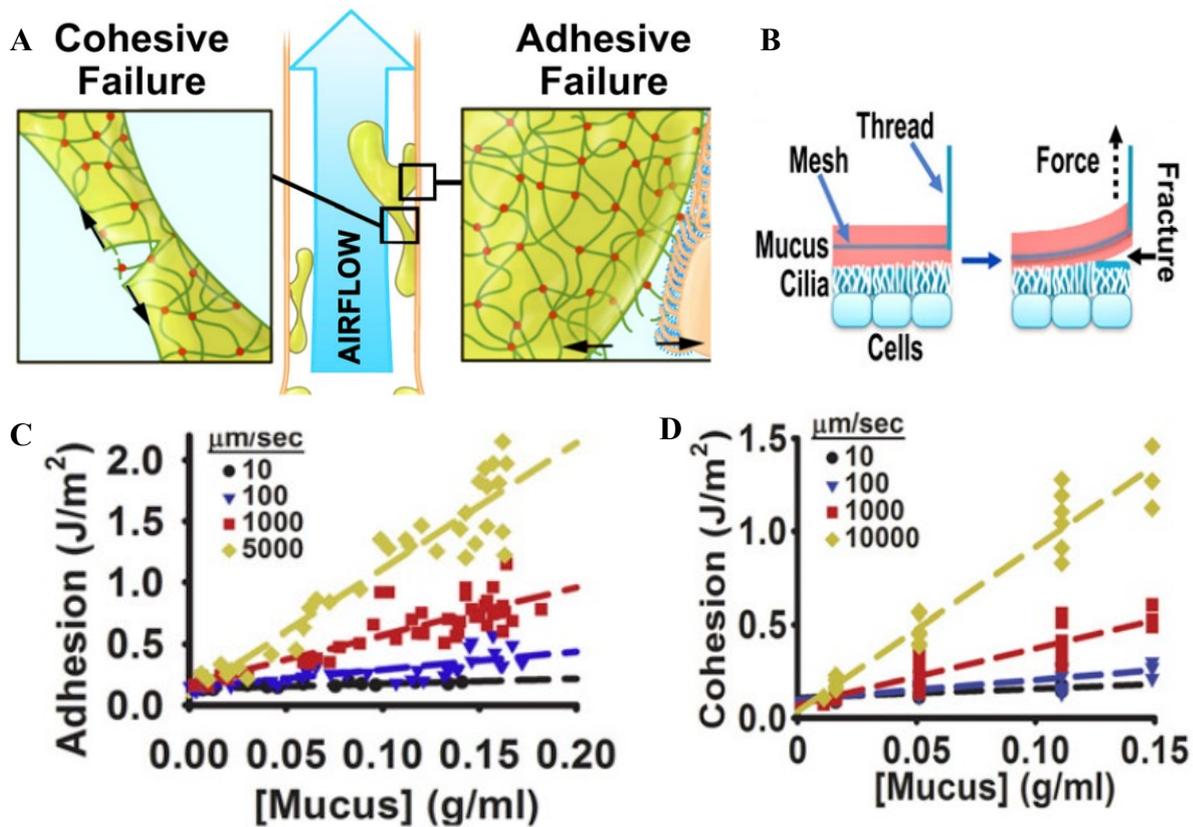


Figure 18 : Adhésion et cohésion du mucus en fonction de sa concentration et de la vitesse de traction. A) Schéma illustrant la différence entre une rupture d'adhésion à une surface à droite, et une rupture de cohésion interne du mucus à gauche. Les flèches noires indiquent la zone de rupture et la direction de traction. B) Schéma de l'expérience réalisée dont les résultats sont montrés dans le panneau C). C) La force d'adhésion du mucus sur l'épithélium en fonction de la concentration du mucus et de la vitesse de traction (symboles et couleurs). D) La force de cohésion du mucus en fonction de la concentration du mucus et de la vitesse de traction (symboles et couleurs). Le mucus et son épithélium sont issus de cultures ALI d'épithélium bronchique humain. Figures d'après Button et al., 2018.

Le mucus présente aussi des propriétés de spinnabilité ou capacité de filetage, c'est-à-dire de former des filaments sous la traction. Elle est liée aux forces de cohésion internes du mucus et à son élasticité. Elle peut atteindre 150 mm (longueur du filament avant rupture). La capacité de filetage dépend de la vitesse de traction mais aussi des propriétés viscoélastiques du fluide comme l'illustre la Figure 19 (Puchelle, Zahm, and Duvivier 1983). On peut y observer que la capacité de filetage semble atteindre un maximum pour une vitesse d'étirement entre 10 et 30 mm/s puis stagner et décroître. Elle paraît également diminuer avec l'augmentation de la viscoélasticité. Plusieurs études ont également montré que la purulence ou contamination du mucus décroît fortement sa capacité de filetage (Puchelle, Zahm, and Duvivier 1983). La capacité de filetage semble corrélée à l'efficacité du transport du mucus par le battement ciliaire, comme le montre la Figure 19C, avec une corrélation plus importante qu'entre capacité de filetage et viscoélasticité (Figure 19). Cela laisse supposer que les propriétés adhésives et de filetage sont toutes aussi importantes, voire plus, que les propriétés viscoélastiques pour l'efficacité du transport du mucus.

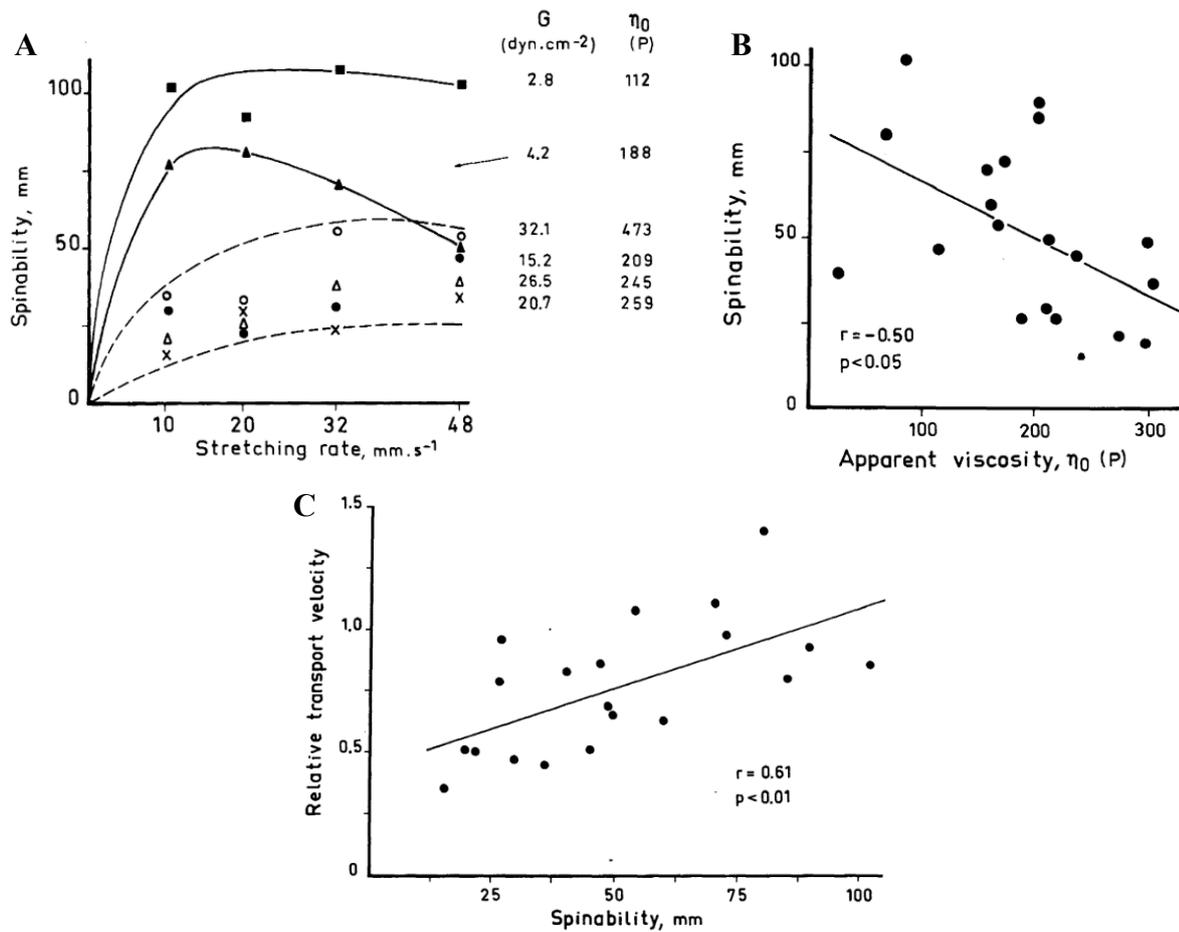


Figure 19: Capacité de filetage du mucus et impact sur le transport mucociliaire. A) Capacité de filetage en fonction de la vitesse de traction pour 6 échantillons d'expectorations spontanées de patients atteints de bronchite chronique. Les valeurs du module élastique noté G et de la viscosité notée η_0 sont indiquées à droite pour respectivement de haut en bas les échantillons correspondant aux symboles : carrés pleins, triangles pleins, ronds vides, ronds pleins, triangles vide et croix. B) Capacité de filetage à une vitesse de traction de 10 mm/s en fonction de la viscosité pour 20 échantillons d'expectorations spontanées de patients atteints de bronchite chronique. Les valeurs r et p indiquées sur le graphique, indiquent le niveau de corrélation entre les deux variables. C) Vitesse de transport des 20 échantillons d'expectorations en fonction de leur capacité de filetage, sur un épithélium cilié de palais de grenouille. La vitesse de transport est exprimée relativement à celle du mucus du palais de grenouille. Figures d'après Puchelle et al., 1983.

Les propriétés adhésives du mucus sous traction, qui regroupent sa capacité de filetage, sa cohésion et son adhésion proprement dite, sont résumées dans la Figure 20.

Adhésion

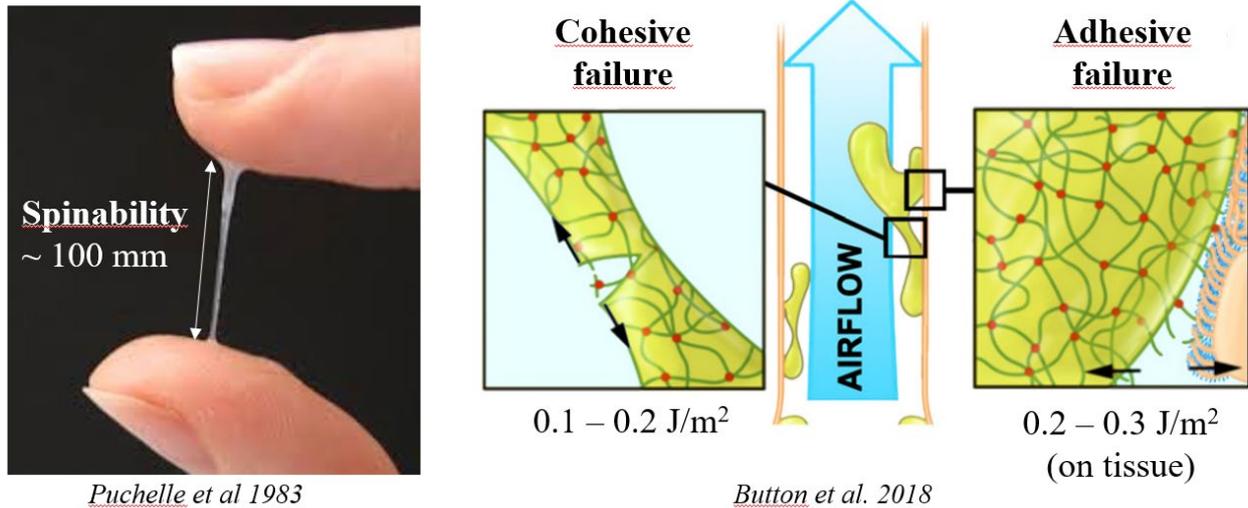


Figure 20 : Bilan des propriétés adhésives du mucus avec une concentration en masse sèche autour de 2%. Les propriétés de filetage (Puchelle, Zahm, and Duvivier 1983), de cohésion et d'adhésion du mucus à l'épithélium (B. Button et al. 2018) y sont représentées et les valeurs intègrent des vitesses de traction jusqu'à 1000 $\mu\text{m/s}$.

I.1.5. Conclusion : le mucus un fluide complexe

Le mucus est un fluide complexe, autant de par sa composition et sa structure que de ses propriétés mécaniques. C'est un hydrogel biologique remplissant plusieurs fonctions : protection, transport, lubrification, ... Il est constitué à plus de 90% d'eau mais contient également des ions, des protéines (dont les mucines), des lipides, de l'ADN et des débris cellulaires. Ces différents éléments interagissent entre eux pour former un réseau complexe et hétérogène, qui peut être modifié en continu grâce à la régulation de la composition du mucus pour adapter ses propriétés à son environnement et aux différentes sollicitations et agressions auquel il est soumis. Les caractéristiques rhéologiques et adhésives du mucus sont donc étroitement liées à sa composition, notamment son taux d'hydratation et sa concentration en protéines, mais aussi la teneur en lipides et ADN qui interagissent fortement avec les protéines.

Globalement, c'est un fluide viscoélastique de type gel, rhéo-fluidifiant, mais également rhéo-solidifiant à large déformation, et à forte adhésivité et cohésion. Il se structure probablement en deux phases bien distinctes, comme le suggère la différence de comportement rhéologique entre l'échelle macro- et microscopique, avec un réseau poreux large et élastique rempli d'une solution aqueuse beaucoup moins viscoélastique.

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation rhéologique du mucus bronchique humain issu du modèle de culture ALI, très peu exploré à notre connaissance (Hill et al., 2014 ; Vasquez et al., 2016). Nous avons cherché à répondre à deux points

en particulier. Premièrement, quel est le comportement rhéologique du mucus à l'échelle de la couche sur l'épithélium et à celui à l'échelle d'un cil, d'une particule ou d'un micro-organisme en son sein ? Peu d'études, qui de plus ont été réalisées pendant ma thèse, ont comparé le comportement du mucus sur ces deux échelles (Bokkasam et al., 2016 ; Gross et al., 2017 ; Weigand et al., 2017), et aucune à notre connaissance sur le mucus bronchique humain. Pour cela deux approches ont été utilisées : la macro-rhéologie en cisaillement ; et la micro-rhéologie active. Deuxièmement, la rhéologie du mucus issu des cultures ALI peut-elle servir comme marqueur des pathologies respiratoires, notamment de la BPCO ? Des études ont été réalisées sur des expectorations qui montrent la plus faible teneur en eau et la plus forte viscoélasticité des échantillons issus de patients atteints de pathologies respiratoires (Serisier et al. 2009; Dawson, Wirtz, and Hanes 2003), mais les expectorations peuvent être contaminées par de la salive ou infectés. L'étude à partir de culture ALI permet de s'affranchir des contaminations et impacts environnementaux. En parallèle de cette caractérisation rhéologique, une étude de la composition biochimique du mucus et une imagerie de sa structure ont été réalisées afin de comprendre le lien entre le comportement rhéologique du mucus et sa composition et structure.

I.2. Méthodes expérimentales et prélèvements du mucus

Le chapitre sur les méthodes ci-dessous est très détaillé. L'essentiel sur les échantillons, les outils utilisés et les protocoles des mesures, est présent dans les parties méthodes des deux articles insérés dans les résultats sur la rhéologie du mucus. Les détails techniques importants et les mesures de vérification pour la validité des résultats présentés sont également présents dans les suppléments des deux articles.

I.2.1. Origines des échantillons de mucus

Au cours de mon projet j'ai pu travailler avec du mucus bronchique humain issu de trois différentes sources comme illustré sur la Figure 21. Deux des mucus sont issus des cultures ALI d'épithélium bronchique humain obtenues avec les milieux de culture BEGM (Lonza) et PneumaCult (Stemcell Technologies) (voir la description en introduction). Le troisième mucus a été prélevé dans les bronches des patients lors d'un examen médical. Des solutions de polysaccharides reproduisant les propriétés viscoélastiques du mucus ont également été préparées. Nous dénommerons par la suite ces mucus BEGM, PneumaCult, *ex vivo* et synthétique.

Le mucus BEGM. Les cultures d'épithélium avec le milieu BEGM ont produit un mucus peu visqueux relativement abondant avec une production d'environ 20 μL par jour par puits de culture (24 mm de diamètre). C'est un mucus d'aspect peu visqueux, homogène et translucide avec une teinte plus ou moins rosée en fonction de son pH légèrement basique. Cette coloration est due à un marqueur de pH présent dans le milieu de culture qui passe dans les cellules puis dans le mucus produit. Ce marqueur est jaune pour les pH acides, incolore à 7.0 et rose pour les pH basiques. Le mucus surnageant a été prélevé délicatement à la micropipette tous les deux jours après dix jours de culture en interface air-liquide. Le mucus de tous les filtres issus d'un même patient, prélevé le même jour, est mélangé et stocké dans un Eppendorf de 1,5 mL à 4°C sur une durée maximum de six mois. Le jour du prélèvement est indiqué par rapport au début de la phase de différenciation de la culture. En moyenne, 500 μL de mucus est ainsi prélevés 3 fois par semaine sur les cultures issues d'un même patient. Les prélèvements ont majoritairement été effectués à l'hôpital universitaire Arnaud de Villeneuve, là où les cultures sont réalisées, par Aurélie Petit et Charlotte Vernisse. J'ai également réalisé quelques prélèvements sur des cultures à plus de 20 jours depuis le début de la phase en interface air-liquide au laboratoire Charles Coulomb. Au total les prélèvements correspondent à des sujets témoins (N= 11), fumeurs (N= 12), et atteints de BPCO (N= 5).

Le mucus PneumaCult. Les cultures d'épithélium avec le milieu PneumaCult ont produit un mucus plus visqueux et adhésif, très chargé en cellules mortes ce qui le rend plus opaque et hétérogène avec la formation d'amas de débris. Il est également légèrement acide d'où sa couleur jaune à incolore due au marqueur de pH. Le taux de production est faible, avec moins de 5 μL par puit et par jour, et le mucus, très adhésif, reste collé au tissu, rendant son prélèvement à la micropipette très difficile. Pour réhydrater et décoller le mucus, 60 μL de milieu ont été ajoutés sur la culture et laissés 24h. Le milieu ajouté sur le tissu a ensuite été prélevé délicatement, en appliquant de façon répétée avec la

micropipette un léger flux de milieu sur la culture, par pression et aspiration, jusqu'au décolllement de la couche de mucus du tissu. Le mucus ainsi prélevé qui colle au bout de la micropipette est tout de suite extrait du media ambiant et stocké dans un Eppendorf de 1,5 mL à 4°C. Ce processus implique donc une dilution du mucus mais qui n'est pas quantifiable. Les analyses sont effectuées au plus tard dans la semaine. Ce prélèvement délicat (et pas toujours fructueux) a été tenté une fois par semaine, à partir de 14 jours minimum après le début de la phase de différenciation, et la quantité extraite de chaque filtre d'un même patient a été mélangée dans le même Eppendorf. En moyenne 30 µL de mucus est ainsi prélevé par patient. Les prélèvements ont été effectués à l'hôpital universitaire Arnaud de Villeneuve de Montpellier où les cultures sont réalisées par Charlotte Vernisse. Au total les prélèvements correspondent à des patients Témoins (N= 2) et atteints de BPCO (N= 2).

Le mucus *ex vivo*. Le mucus *ex vivo* a été prélevé lors de bronchoscopie durant un examen médical à l'hôpital universitaire Arnaud de Villeneuve de Montpellier. Le mucus est aspiré doucement à l'aveugle grâce à une seringue reliée à un cathéter inséré jusqu'à la 6^e à 9^e divisions bronchiques. Le volume ainsi récolté est très faible, de 15 µL en moyenne, pour éviter de blesser le tissu et d'avoir du sang dans le mucus. Il est incolore, voire légèrement gris, hétérogène avec la présence d'amas de débris visibles à l'œil nu et plus adhésif et visqueux que le mucus BEGM. Il est stocké à 4°C dans un Eppendorf de 1,5 mL saturé préalablement en humidité dans un incubateur. Le mucus *ex vivo* est préparé pour les expériences en micro-rhéologie en moins de 2h après le prélèvement et analysé dans les 12h. Les échantillons contenant du sang visible à l'œil nu, c'est-à-dire avec une coloration rouge ou rosée, ne sont pas retenus. Ces prélèvements ont été réalisés par Paul Raynaud à l'hôpital universitaire Arnaud de Villeneuve de Montpellier sur des patients sans pathologies respiratoires infectieuses (N=7).

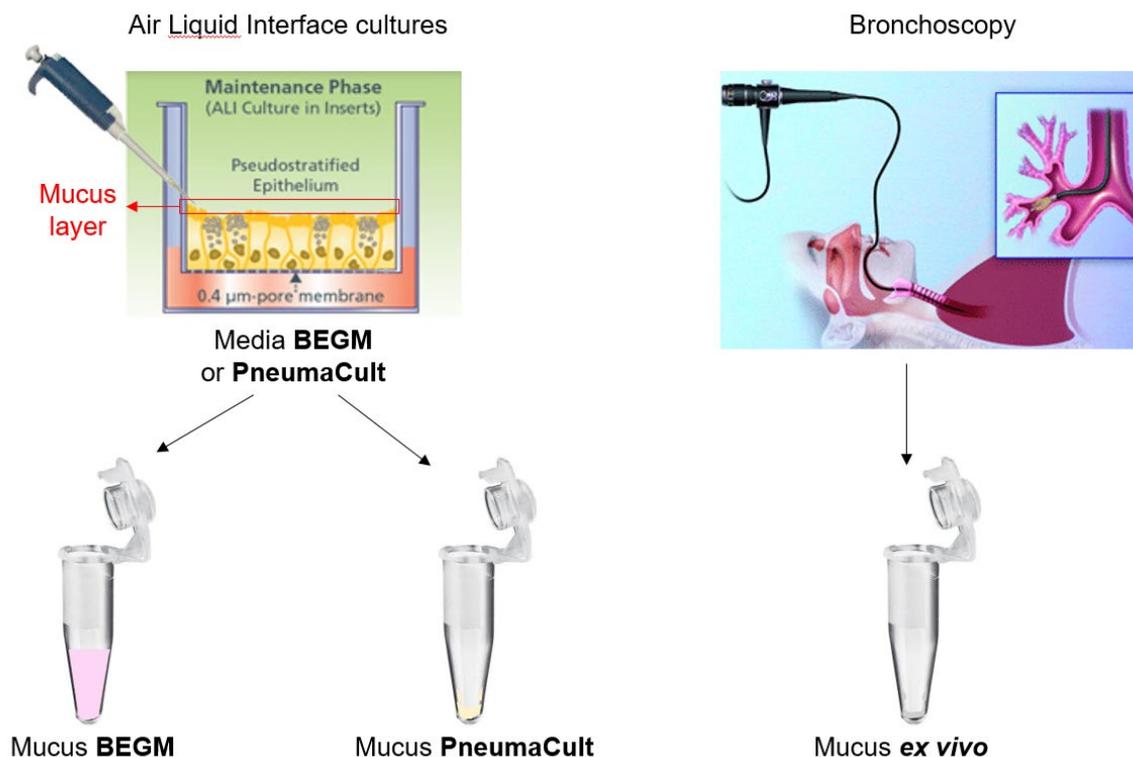


Figure 21 : Schéma de l'origine et du prélèvement des trois types de mucus bronchique humain étudiés : celui issu des cultures BEGM, celui issu des cultures PneumaCult et le mucus ex vivo prélevé dans les bronches.

Le mucus synthétique. Pour comprendre l'influence de la concentration en protéines sur la rhéologie du mucus, notamment les différences entre l'échelle macroscopique et microscopique, nous avons préparé plusieurs solutions de polysaccharides de concentration différentes. En suivant le protocole élaboré par Lafforgue et al (Lafforgue, Bouguerra, et al. 2017; Lafforgue, Poncet, et al. 2017; Lafforgue et al. 2018), nous avons utilisé un mélange de gomme de galactomannane (Viscogum FA, CargillTM) et de scléroglycane (Actigum CS 6, CargillTM) afin de reproduire les propriétés rhéologiques du mucus. La gomme de galactomannane est une fibre végétale aux propriétés rhéofluidifiantes composée de chaînes linéaires solubles de mannose avec des ramifications de galactose. Le scléroglycane est issu de la fermentation de microchampignons, il est composé d'une chaîne ramifiée de glucose et possède des propriétés gélifiantes. Dans une solution saline préalablement préparée à 0,9 % en masse de NaCl, la gomme de galactomannane est ajoutée avec fraction massique finale dans la solution de 0,5 %. La solution est remuée à température ambiante grâce à un agitateur magnétique pendant 1h puis le scléroglycane est incorporé très doucement (en pluie fine), toujours sur l'agitateur magnétique, afin d'éviter la formation d'amas. La quantité de scléroglycane ajoutée varie d'une solution à l'autre et lorsque nous parlerons de concentration de notre mucus synthétique c'est à la concentration en scléroglycane que nous nous référerons. Nous avons préparé des solutions avec une concentration massique finale de : 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 et 2 % de scléroglycane. Pour finir, la préparation des solutions, après l'ajout du scléroglycane la

solution est laissée sur l'agitateur pendant 48h. Puis, pour consolider la connexion en cours des chaînes de gomme de galactomannane, une solution de di-sodium tetraborate, aussi appelé Borax, de concentration à 0,02 mol/L, est ajouté en respectant la proportion de 2% du volume finale de la solution. La solution est laissée 1h sous l'agitateur magnétique puis stockée à 4°C pour une future utilisation. Les solutions pouvant s'altérer au cours du temps (contamination, séparation de phase de la solution) elles ne sont pas conservées plus d'un mois.

I.2.2. Rhéologie

I.2.2.1. Principes

La rhéologie est l'étude de l'écoulement et de la déformation d'un matériau sous l'action d'une contrainte ou déformation imposée. Les caractéristiques rhéologiques d'un matériau sont notamment liées à ses propriétés élastiques et visqueuses, c'est-à-dire sa capacité à stocker l'énergie et/ou la dissiper. On peut diviser les matériaux en trois grandes catégories : les solides purement élastiques (viscosité infinie), les liquides purement visqueux dit Newtoniens (élasticité nulle), et les matériaux viscoélastiques intermédiaires entre les deux. On peut également distinguer trois types de déformation ou de contrainte imposée : en compression, en extension, et en cisaillement. Par la suite nous nous concentrons sur le cas des matériaux viscoélastiques, en rhéologie de cisaillement. Les principes de la rhéologie décrits ci-dessous sont très bien détaillés, entre autre, dans le livre de Macosko (Macosko 1996).

Courbe d'écoulement : viscosité et seuil d'écoulement. L'une des propriétés importantes des matériaux que l'on mesure en rhéologie est la viscosité η , notamment son évolution en fonction de la contrainte τ ou de la dérivée temporelle de la déformation $\dot{\gamma}$, appelé taux de cisaillement dans le cas de la rhéologie en cisaillement. Dans le cas d'un fluide Newtonien, la viscosité est constante quel que soit la contrainte ou le taux de cisaillement imposé avec $\tau = \eta\dot{\gamma}$. Dans le cas d'un fluide non-Newtonien, cette viscosité n'est pas constante et peut évoluer en fonction de la contrainte ou du taux de cisaillement imposé. On distingue ainsi les fluides rhéofluidifiants lorsque la viscosité diminue avec l'augmentation de la contrainte ou du taux de cisaillement et inversement les fluides rhéoépaississants lorsque la viscosité augmente, comme l'illustre la Figure 22B. Il est important également de mentionner le cas des fluides à seuil, c'est-à-dire que l'écoulement ne se produit qu'à partir d'une contrainte seuil τ_c comme illustré sur la Figure 22A. On peut retrouver parmi les fluides à seuil des fluides qui se comportent comme des liquides Newtonien à plus grand taux de cisaillement, avec une viscosité constante (fluides de Bingham). Mais il y a aussi des fluides rhéofluidifiants ou rhéoépaississants.

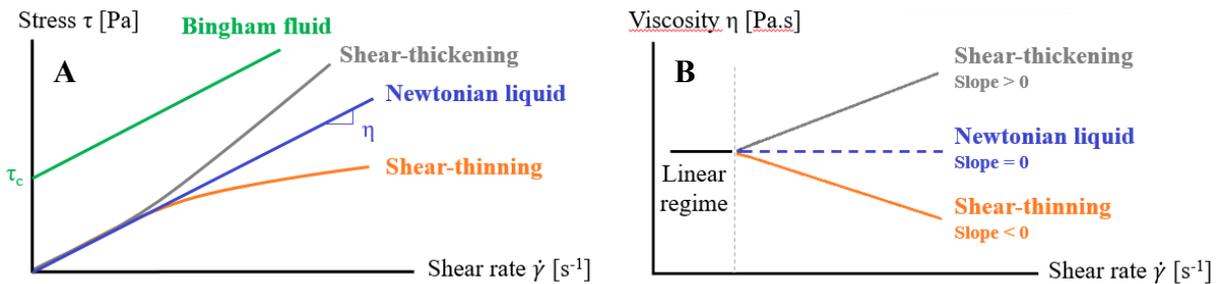


Figure 22 : Illustration des propriétés d'écoulement des matériaux. Les deux graphes représentent une mesure de courbe d'écoulement, c'est-à-dire une mesure de la contrainte τ associée à un taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ continu et croissant A) ou de la viscosité η associée B). Sur ces graphes sont représentés les cas des fluides Newtonien (en bleus), rhéofluidifiants (« shear-thinning » en orange), rhéoépaississants (« shear-thickening » en gris) et le cas des fluides à seuil de type Bingham (en vert).

Mesures dynamiques et détermination des modules viscoélastiques. Dans le cas des fluides et matériaux viscoélastiques, deux paramètres sont particulièrement représentatifs pour caractériser le matériau et déterminer si son comportement est à dominance élastique ou visqueuse pour l'échelle de temps considérée. Ce sont le module élastique G' , également appelé module de stockage, et le module visqueux G'' , également appelé module de dissipation ou de perte. Ils sont extraits du module complexe $G^* = \tau^* / \gamma^* = G' + iG''$, avec τ^* la contrainte et γ^* la déformation, subies par l'échantillon, en notation complexe, et i le nombre complexe. Le module complexe G^* est déterminé en appliquant une contrainte ou une déformation sinusoïdale, d'amplitude τ_0 ou γ_0 et de fréquence angulaire ω , et en mesurant la déformation ou la contrainte correspondante ainsi que le déphasage ϕ entre les deux signaux (Figure 23A). L'évolution du module G^* en fonction de la fréquence renseigne sur le comportement à dominance élastique ou visqueux du matériau (Figure 23B). Dans le cas d'un matériau purement élastique, la pente de $G^*(\omega)$ est nulle. Cela est dû au déphasage $\phi=0$ entre le signal de la déformation $\gamma(t)$ et celui de la contrainte $\tau(t)$. Dans le cas d'un matériau purement visqueux, la pente de $G^*(\omega)$ vaut 1 car le déphasage $\phi=\pi/2$, les signaux $\gamma(t)$ et $\tau(t)$ sont en quadrature de phase. L'évolution des modules G' et G'' en fonction de la fréquence permet sur le même principe de déterminer le comportement dominant, également grâce au rapport G''/G' , mais aussi de déterminer le ou les temps caractéristiques du matériau, s'il y en a, qui sont les points où les courbes $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ se croisent. Par exemple, dans le cas d'un fluide dit de Maxwell il y a un seul temps caractéristique. Pour le mucus, il semble ne pas y avoir de croisement avec un comportement des modules viscoélastiques en fonction de la fréquence en loi de puissance (cf partie I.1.3.). Cela signifie que le mucus n'a pas de temps caractéristique ou en possède une infinité.

Régimes linéaire et non linéaire. En rhéologie, le régime linéaire du matériau correspond au régime où les valeurs du module élastique G' , du module visqueux G'' et de la viscosité η , sont indépendants des variations de contraintes τ , déformations γ et taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ appliqués. Lorsque cela n'est plus le cas, le matériau est en régime non-linéaire. Les valeurs seuils de τ , γ et $\dot{\gamma}$ qui marquent la

transition entre les deux régimes sont propres à chaque matériau. La caractérisation des modules élastique G' et visqueux G'' en fonction de la fréquence se fait toujours en régime linéaire.

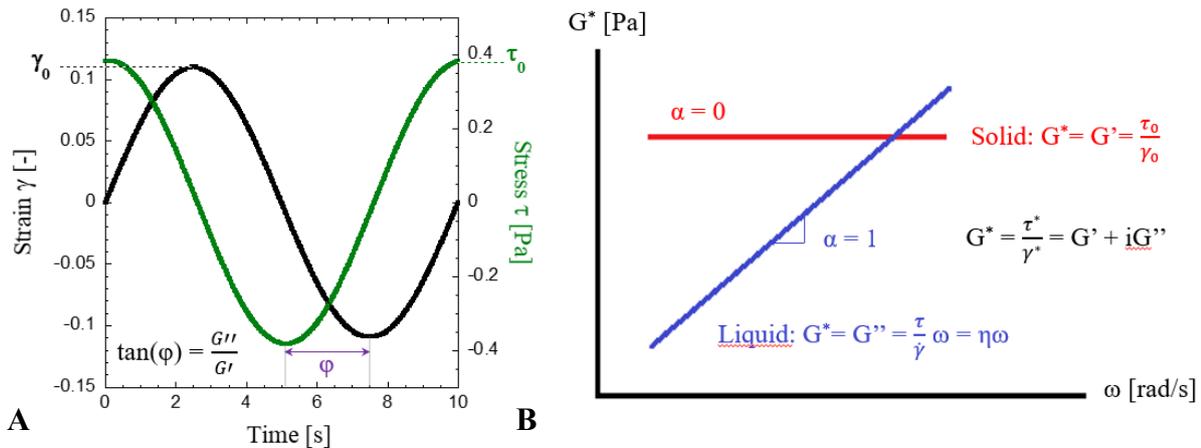


Figure 23 : Principe des mesures de rhéologie dynamique avec une contrainte τ ou une déformation γ imposée sinusoïdale, afin de calculer les modules viscoélastiques G' et G'' . A) Mesure de la contrainte au cours du temps (courbe verte) sur un fluide viscoélastique, sous une déformation sinusoïdale imposée (courbe noire), d'amplitude γ_0 à la fréquence de 0,1 Hz. Le rapport des amplitudes entre γ_0 et celle du signal de la contrainte mesurée τ_0 , ainsi que le déphasage ϕ entre les deux signaux, permettent de déduire les valeurs des modules élastiques G' et visqueux G'' . B) Illustration sur une double échelle logarithmique du comportement de $G^* = \tau^*/\gamma^*$ en fonction de la fréquence angulaire ω du signal sinusoïdal imposé pour les deux cas extrêmes que sont un solide purement élastique (droite rouge) et un liquide purement visqueux (droite bleu) de viscosité η .

I.2.2.2. Macro-rhéologie de cisaillement

I.2.2.2.1. Choix du rhéomètre et de la géométrie

A) Pour la rhéologie linéaire

Les mesures de macro-rhéologie linéaire ont été réalisées en rhéologie de cisaillement, avec un rhéomètre Anton Paar à contrainte imposée (le MCR502 et le MCR302). Plusieurs géométries (plan/plan, cône/plan, Couette) et taille de géométrie sont possibles sur les rhéomètres. Chaque géométrie a ses avantages et ses inconvénients et son choix doit être adapté à l'échantillon que l'on souhaite analyser. La géométrie Couette par exemple, est à privilégier pour les échantillons à très faible viscoélasticité, proche de l'eau, car elle maximise la surface de contact avec l'échantillon, ce qui maximise le couple transmis. Mais elle nécessite aussi un volume d'échantillon plus élevé. Bien que nos échantillons de mucus BEGM soient faiblement viscoélastiques, nos volumes d'échantillons étant faibles, la géométrie cône / plan a été choisie, avec un diamètre du cône de 25mm et un angle de 1° . Cette géométrie nécessite 80 μL d'échantillon, comme illustré sur la Figure 24. De plus, contrairement à la géométrie plan/plan, la géométrie cône/plan permet une contrainte τ et un taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ imposés homogènes en tout point de l'échantillon entre le plan et le cône, soit $\dot{\gamma} = \Omega/\theta$ et $\tau = 3M/2\pi R^3$, avec Ω la vitesse de rotation du cône, R son rayon et θ son angle, et M le

couple transmis par l'échantillon en N.m. Afin de vérifier que le cône choisi permet d'obtenir des mesures cohérentes et fiables, malgré la faible viscoélasticité de nos échantillons, des tests préliminaires ont été réalisés. Sur des fluides viscoélastiques, aux valeurs des modules viscoélastiques proches de celles du mucus (gel dilué, micelles géantes), des mesures ont été effectuées avec la géométrie Couette et celle cône/plan choisie, ainsi qu'avec un cône plus large. Les valeurs obtenues des modules élastiques G' et visqueux G'' sont similaires, de même que leur évolution en fonction de la contrainte ou de la fréquence imposée. Afin de caractériser et comparer le comportement rhéologique des échantillons, des ajustements en loi de puissance sont appliqués aux courbes de G' et G'' en fonction de la fréquence, ainsi qu'aux courbes de la viscosité en fonction du taux de cisaillement.

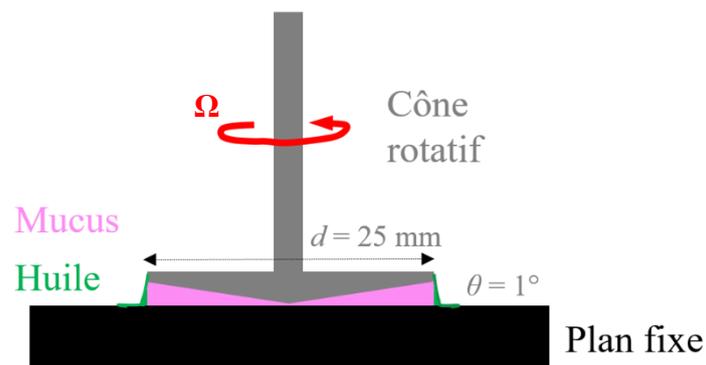


Figure 24 : Schéma de la disposition de nos échantillons pour les mesures de macro-rhéologie avec une géométrie cône/plan. Le cône choisi est en acier, lisse, de 25 mm de diamètre et 1° d'angle. Il nécessite $80 \mu\text{L}$ d'échantillon (en rose) et c'est lui qui est mis en rotation à la vitesse Ω afin d'appliquer la contrainte ou déformation en cisaillement. Le plan en dessous est fixe et est équipé d'un régulateur de température. De l'huile de silicone de 20 mPa.s de viscosité est placée autour du cône et de l'échantillon (en vert) afin d'éviter l'évaporation du fluide en cours de mesure.

B) Pour la rhéologie non linéaire à larges déformations sinusoïdales (LAOS)

Quelques mesures préliminaires en régime non linéaire à larges déformations ont également été réalisées. Pour ces mesures, le rhéomètre ARES à déformation imposée a été choisie, avec une géométrie cône/plan de 25mm de diamètre et un angle de $1,15^\circ$. Les échantillons de mucus BEGM sont faiblement viscoélastiques et le régime linéaire est limité aux très faibles taux de déformation, inférieurs à 5%. Le rhéomètre ARES à notre disposition possède un capteur moins sensible que l'Anton Paar ce qui n'a pas permis de l'utiliser en régime linéaire sur le mucus. En revanche il permet d'accéder aux données brutes, c'est-à-dire aux signaux temporels de la déformation imposée et de la contrainte mesurée, avec 5 cycles, ce que ne permet pas l'Anton Paar qui nous permet d'accéder à seulement un cycle. A cause des limites de sensibilité du capteur, le régime non linéaire a été exploré avec fiabilité qu'à partir de 50% de taux de déformation imposée. Mais ce rhéomètre peut disposer d'un capteur plus sensible (en réparation pendant mon projet). Il sera donc possible et souhaitable à

l'avenir d'effectuer toutes les mesures de macro-rhéologie (linéaires et non linéaires) sur ce rhéomètre.

I.2.2.2.2. Conditions expérimentales

Les limites du rhéomètre. Le mucus est un fluide biologique complexe de faible viscoélasticité avec G^* de l'ordre de 1 Pa. Il est donc important de vérifier si nos mesures respectent les limites de détection de couple du rhéomètre, fixé à 1 nN.m, avec la géométrie que nous utilisons qui est un cône de 25 mm de diamètre et 1° d'angle. Cette limite est respectée même avec un facteur 10 pour plus de précaution et fiabilité sur nos mesures (Figure 25). Une autre limite importante, dans le cas des mesures dynamiques, est celle de l'inertie de la géométrie qui biaise les mesures à haute fréquence, avec un effet sur G^* proportionnel à la fréquence au carré ω^2 (Ewoldt, Johnston, and Caretta 2015). Dans le cas de l'étude du mucus, il est intéressant de mesurer sa réponse rhéologique pour des fréquences équivalentes à celles du battement ciliaire entre 5 et 20 Hz mais cette gamme est au-delà de la limite due à l'inertie de la géométrie (Figure 25B) et nous devons veiller à ne pas prendre en compte les mesures de G' et G'' qui augmentent soudainement au-delà de cette limite. Lors des mesures continues de la courbe d'écoulement, l'inertie n'est pas problématique mais un phénomène d'écoulement secondaire du fluide apparaît à grand taux de cisaillement qui biaise les mesures de viscosité. Le seuil d'apparition de cet effet dépend de la densité et viscosité du fluide ainsi que de la taille de la géométrie et de la distance d'entrefer (« gap »). Les formules qui ont servi à calculer ces limites sont issues de l'article de Ewoldt et al. de 2015 (Ewoldt, Johnston, and Caretta 2015) en prenant en compte : les dimensions du cône ; la limite du couple du rhéomètre utilisé ; l'inertie I de la géométrie mesurée à $1,16 \mu\text{N.m.s}^2$ par le rhéomètre ; la densité ρ du mucus estimée équivalente à celle de l'eau soit 1000 kg/m^3 ; le déphasage δ entre G' et G'' , qui vaut en moyenne 0.3 ± 0.1 rad, pour l'estimation de l'inertie du mucus ; et un nombre de Reynolds critique de 1 pour le calcul du début des effets d'écoulement secondaire dans les mesures de courbe d'écoulement. Ce nombre de Reynolds critique est estimé pour une erreur de mesure du couple de 1% et une viscosité du mucus η_0 correspondant à l'amplitude de l'ajustement en loi de puissance de la courbe $\eta(\dot{\gamma})$ de 0,4 Pa.s en moyenne sur l'ensemble de nos échantillons.

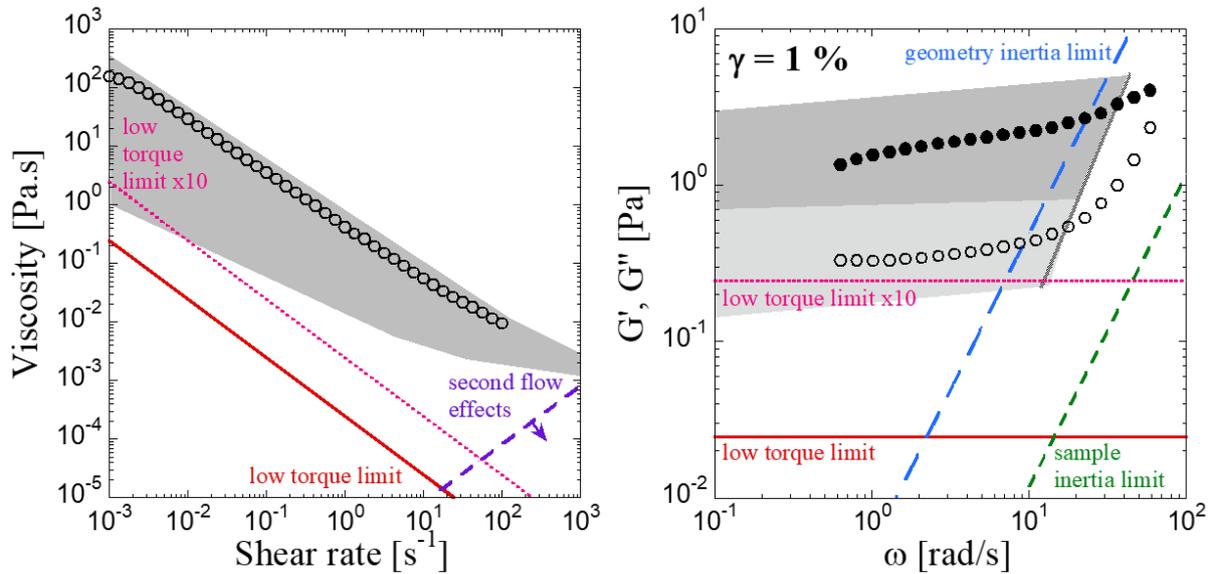


Figure 25 : Limites de mesure du rhéomètre Anton Paar, avec la géométrie utilisée, sur nos échantillons de mucus en mesures continues A) et dynamiques B). A) Courbe d'écoulement avec la viscosité représentée en fonction du taux de cisaillement. Un exemple de mesure sur le mucus (ronds noirs et vides) et la plage couverte par tous les échantillons (zone grise) sont représentés. B) Mesure des modules viscoélastiques G' et G'' pour une déformation γ sinusoïdale fixée à 1% en fonction de la fréquence ω . Un exemple de mesure sur le mucus (G' rond noirs pleins et G'' rond noirs vides) et les plages couvertes par tous les échantillons (G' en gris foncé et G'' en gris clair) sont représentés. La limite à droite des plages est la limite de prise en compte des mesures. Les droites représentées sur les deux panneaux A) et B) sont : la limite liée au couple minimum détectable (ligne pleine rouge) et cette limite avec un facteur 10 (ligne pointillée rose) ; la limite d'apparition d'un écoulement secondaire (ligne discontinue violette) sur le panneau A) ; les limites d'inerties liées à la géométrie (ligne discontinue à tirets long et bleu) et au fluide (ligne discontinue à tirets courts et vert) sur le panneau B). Les limites sont obtenues grâce aux relations décrites dans l'article de Ewoldt et al de 2015.

L'évaporation. Lors de nos manipulations sur le mucus, nous avons observé une évaporation rapide, nettement supérieure à celle de l'eau pure. Une mesure de la vitesse d'évaporation du mucus a été réalisée grâce à un appareil ATG (partie mesure masse sèche I.2.3.1.), et comparée à celle de l'eau pure et de l'eau salée à 0,9 g/L de NaCl (soit environ la concentration mesurée dans le mucus). L'évaporation s'est faite à une température de 25°C sous un flux d'azote à un débit de 10 mL/min, à partir de 20 μ L d'échantillon. Les résultats, illustrés sur la Figure 26, confirment un taux d'évaporation plus important du mucus comparé à l'eau pure sur les temps courts, mais sur les temps long cette différence tend à s'estomper. De plus l'évaporation reste inférieure à celle de l'eau salée avec une concentration équivalente au mucus en NaCl. Pour éviter l'évaporation au cours de nos mesures de macro-rhéologie, deux approches ont été testées : une hotte saturée d'humidité autour de l'échantillon ; et de l'huile déposée autour du cône à l'interface entre l'échantillon et l'air (Figure 24). L'efficacité des différents dispositifs a été vérifiée grâce à une mesure des modules G' et G'' en régime linéaire à 1Hz au cours du temps. Si les modules augmentent au cours du temps c'est le signe d'une évaporation de l'eau contenu dans le mucus, qui se concentre donc et devient plus

viscoélastique. Après plusieurs tests de hottes et d'huiles de viscosités différentes, nous avons sélectionné l'huile de silicone, avec une viscosité de 20 mPa.s, qui s'est révélée plus efficace sur les temps long (supérieur à 30 min). La viscosité a été choisie afin de limiter les effets de frottement entre l'échantillon et l'huile qui pourrait affecter les mesures. Le mucus analysé étant faiblement viscoélastique, l'utilisation d'une huile plus visqueuse que l'échantillon engendre une résistance non négligeable qui fausse les mesures et surestime la mesure de la viscoélasticité.

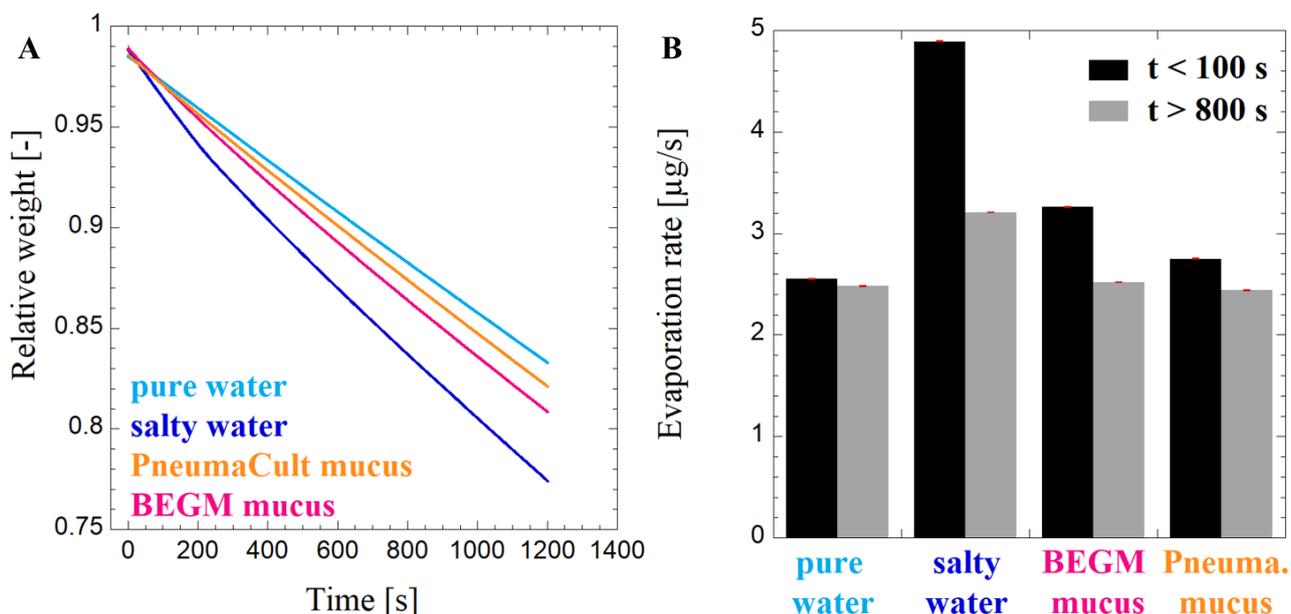


Figure 26 : Taux d'évaporation du mucus comparé à celui de l'eau. Le taux d'évaporation a été mesuré avec le même protocole entre les quatre échantillons comparés que sont l'eau pure (bleu clair), l'eau salée avec une concentration de 0,9 g/L de NaCl (bleu foncé), le mucus BEGM (rose) et le mucus PneumaCult (orange). A) La masse m relative de l'échantillon (par rapport à celle initiale) au cours du temps t . B) Un fit linéaire est appliqué aux courbes $m(t)$, sur la période 0-100 s (noir) et celle 800-1200 s (gris), et la pente qui correspond au taux d'évaporation est représentée. L'incertitude du fit est de l'ordre de 10^{-3} $\mu\text{g/s}$ (tiret rouge).

La température. Après avoir vérifié que le comportement rhéologique du mucus est similaire entre 20, 30 et 37°C (Figure 27), toutes les mesures ont été effectuées à 20°C. Cette température a été choisie afin de limiter l'évaporation du mucus. De plus, la viscoélasticité augmentant faiblement avec la diminution de la température, cela permet aux mesures de s'éloigner un peu plus de la limite de détection du rhéomètre, qui est très proche pour ces échantillons avec la géométrie utilisée. 20°C est également proche de la température ambiante de la salle de mesure (22-25°C) et permet donc de réduire le temps d'attente de mise à l'équilibre thermique de l'échantillon avant de commencer les mesures.

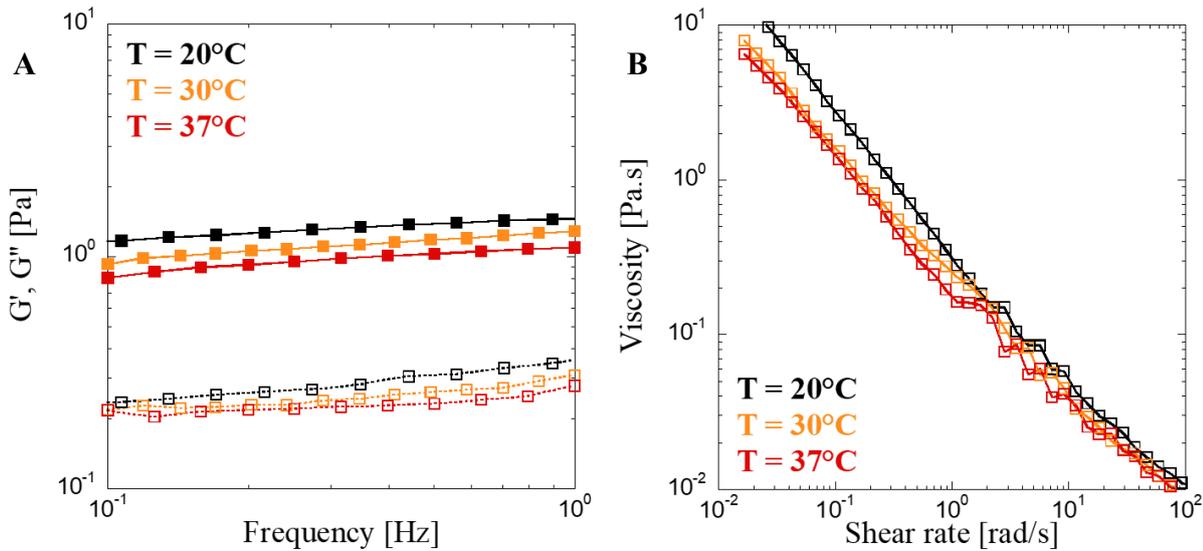


Figure 27 : Effet de la température sur la macro-viscoélasticité d'un mucus BEGM. A) Le module élastique G' (carrés pleins) et le module visqueux G'' (carrés vides) en fonction de la fréquence. B) La viscosité (carrés vides) en fonction du taux de cisaillement. Trois valeurs de température T ont été testées sur un échantillon de mucus : $T = 20^\circ\text{C}$ (courbes noires), $T=30^\circ\text{C}$ (courbes orange) et $T=37^\circ\text{C}$ (courbes rouges).

Les mesures. Une fois l'échantillon en place, c'est-à-dire qu'il recouvre toute la surface du cône sans déborder, le film d'huile de silicone est placé autour. Nous attendons 5 min pour permettre la relaxation du mucus et l'homogénéisation de sa température à 20°C . Afin de limiter les effets de pré-déformation subis par le mucus, nous commençons par effectuer les mesures dynamiques à contrainte ou déformation imposée sinusoïdales. Le même test a été répété à différents intervalles pour déterminer à partir de quelle durée on retrouve systématiquement une superposition des courbes, ce qui nous a permis de définir 3 min d'attente entre chaque nouvelle mesure pour permettre la relaxation et le retour à l'équilibre du mucus. Pour les premiers échantillons, lorsque le régime linéaire du mucus n'était pas encore défini, nous commençons par un balayage en contrainte à 0,1 et 1 Hz. Une fois le régime linéaire défini, nous avons par la suite commencé par un balayage en fréquence, de 0,1 à 10 Hz, avec un taux de déformation imposée de 1% pour tous les échantillons. A cause des effets d'inertie du moteur du rhéomètre et de la géométrie utilisée, l'Anton Paar montre des instabilités sur le signal de la contrainte avec une oscillation à plus haute fréquence qui s'ajoute au signal imposé à partir d'environ 5 Hz dans le mucus (Figure 25). Nous avons donc limité le balayage en fréquence à 10 Hz, soit la moyenne des fréquences du battement ciliaire que nous mesurons sur les cultures d'épithélium. Un balayage en déformation de 1 à 100%, pour une fréquence de 1Hz, est ensuite appliqué. Pour les mesures dynamiques nous imposons typiquement 5 cycles par mesure (contre 15 cycles initialement pour les premiers échantillons avec le même résultat). Pour finir, une mesure de courbe d'écoulement, c'est-à-dire une mesure continue de taux de cisaillement imposé, est appliquée. Le temps d'attente permettant d'atteindre le régime stationnaire de viscosité pour un taux de cisaillement imposé a été mesuré. Il est inférieur à 10 s sur toute la gamme de taux de cisaillement imposé de 10^{-3} à 10^2 rad/s. Sur 7 échantillons de patients différents, afin de vérifier la présence d'un

seuil d'écoulement pour le mucus et de le quantifier précisément, nous avons également effectué ce que l'on appelle un essai de fluage ('creep test' en anglais), c'est-à-dire qu'une contrainte constante est appliquée et la déformation est mesurée au cours du temps. Nous avons commencé avec une contrainte imposée de 0,001 Pa, lorsque les limites de sensibilité du rhéomètre le permettaient, avec un pas de 0,005 Pa. Sur l'ensemble des mesures effectuées il n'y a pas de barres d'erreur affichées. Une répétition d'une mesure sur un échantillon déjà en place donne une superposition quasi parfaite des points. Des tests sur le même lot d'échantillons (effectué sur un seul échantillon de mucus au volume abondant), donnent des valeurs quasiment identiques, en tenant compte de la taille du symbole affiché sur les graphes.

Cas des mesures de rhéologie non linéaire à larges déformations sinusoïdales (LAOS). Les échantillons sont analysés sur le rhéomètre ARES en déformation imposée avec une géométrie cône/plan de 25mm de diamètre et un angle de $1,15^\circ$. Les mesures sont effectuées à température ambiante (22-25°C). Des gammes de déformation de 1 à 1000 % sont imposées pour deux valeurs de fréquence : 0,1 et 1 Hz. A cause des limites de mesure de couple du rhéomètre, seules les valeurs de déformation supérieures à 50% sont fiables et exploitables. Les signaux de la déformation imposée et de la contrainte mesurée sont ensuite analysés avec le programme MITlaos sous MatLab créé par Ewoldt, Winter et McKinley (version 2.2 Beta). Sur les 5 cycles à notre disposition, le premier n'est pas pris en compte car l'amplitude est plus importante que pour les 4 autres cycles (Figure 28A). Sur les 4 cycles restant, la transformée de Fourier du signal mesuré est calculée afin d'extraire les différentes harmoniques du signal. Cela permet de calculer le module élastique G'_1 au mode fondamental ainsi que les autres contributions élastiques pour chaque harmonique impaire et notamment la première, G'_3 (Figure 28B et C). Ce programme calcule également un cycle moyen des 4 cycles donnés et représente l'ellipse du signal de la contrainte en fonction de celui de la déformation, nommées ellipses de Lissajous. Le calcul de la pente de la tangente de l'ellipse pour le point de déformation nulle permet d'obtenir le module élastique G'_M , et la pente de la droite reliant le centre de l'ellipse (contrainte et déformation nulles) au point de maximum de déformation permet d'obtenir G'_L le module élastique pour la déformation maximale (Figure 28D).

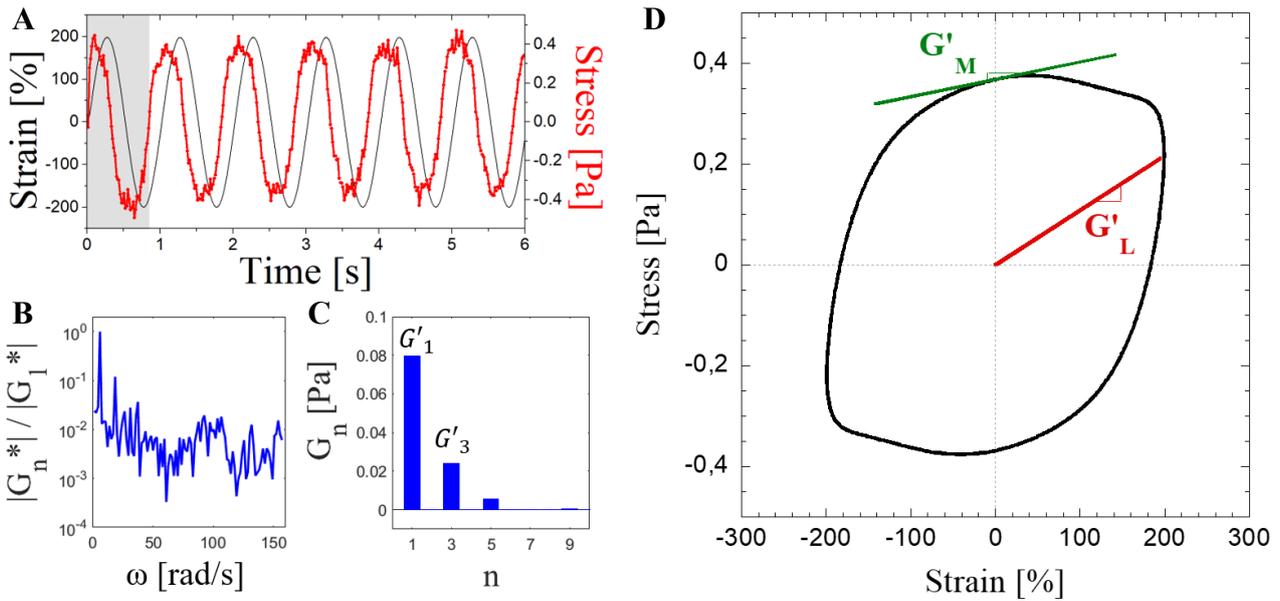


Figure 28 : Rhéologie non linéaire à large déformation. Illustration de l'analyse effectuée avec MITlaos sur du mucus BEGM. A) Signal de la déformation imposée (noire) et de celui de la contrainte mesurée (rouge), au cours du temps, sur cinq cycles. La plage grise représente le premier cycle qui n'est pas pris en compte pour l'analyse. B) Spectre de la transformée de Fourier du signal de la contrainte sur celui de la déformation, soit G^* , normalisé par la valeur correspondant à la fréquence fondamentale. C) Valeur du module élastique G' en fonction de l'ordre n de l'harmonique, avec $n=1$ pour la fréquence fondamentale. D) Signal de la contrainte sur celui de la déformation, appelée ellipse de Lissajous, moyennée sur les quatre cycles (noir). La ligne verte représente la tangente de l'ellipse pour une déformation nulle et la ligne rouge représente la droite passant par le centre de l'ellipse et le point de déformation maximum.

I.2.2.3. Micro-rhéologie et mesures de forces avec un piège optique

I.2.2.3.1. Présentation des Pincettes Optiques

A) Principes du piège optique

Les pincettes optiques ont été inventées dans les années 1980 par l'équipe d'Ashkin. Le principe repose sur la focalisation en un point d'un faisceau lumineux à longueur d'onde unique, comme un laser (Figure 29A). La focalisation d'une lumière, à l'aide d'un objectif fortement convergent et à grande ouverture numérique, engendre un gradient de champ électromagnétique autour du point de focalisation (Figure 29B). Cela crée un piège optique pour toute particule d'indice de réfraction supérieur à celui du milieu (Ashkin, Dziedzic, and Chu 1986). Le gradient de champ est alors à l'origine d'une force (force de gradient électromagnétique), qui ramène la particule au point de focalisation. Cette force dépend notamment de la distance au point de focalisation et de l'intensité du faisceau laser. En première approximation, le piège optique se décrit par un potentiel d'énergie quadratique proportionnel à la distance au carré au centre du piège (Figure 29C). Il est caractérisé par

une raideur du piège optique k_{OT} . Cette raideur dépend de l'intensité du faisceau laser au niveau du point de focalisation (donc de la puissance du laser mais aussi des propriétés du milieu comme son indice optique), et des propriétés des objets qui peuvent être piégés (absorbance à la longueur d'onde du laser utilisé, différence d'indice optique avec le milieu, taille, ...).

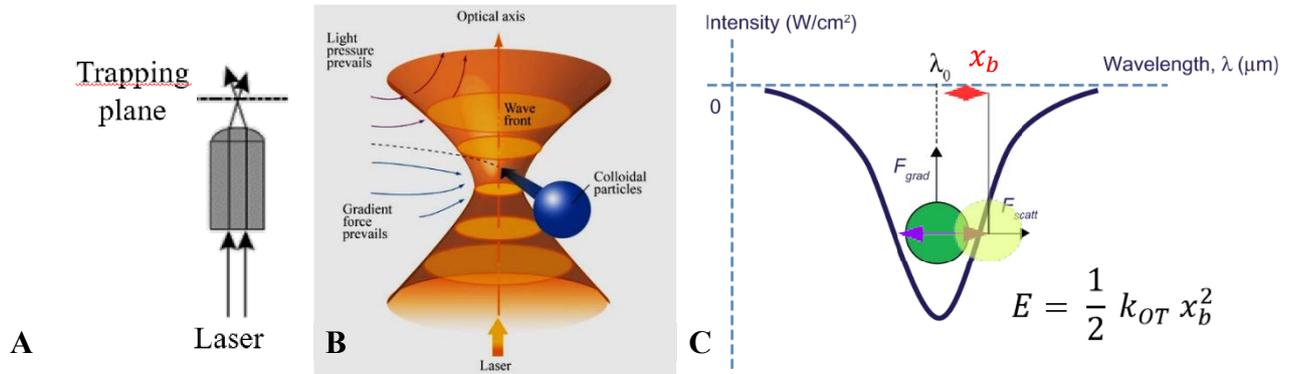


Figure 29 : Schéma du principe des pincettes optiques. A) Focalisation du faisceau laser par l'objectif à forte ouverture numérique pour former le piège optique. B) Force de gradient électromagnétique exercée par le piège optique. C) Potentiel d'énergie E ressenti par une bille dans le voisinage du piège optique, avec k_{OT} la raideur du piège optique et x_b la distance de la bille au centre du piège.

Les pincettes optiques permettent ainsi de mesurer des forces F grâce à la relation :

$$F = k_{OT} x_b$$

avec k_{OT} la raideur du piège optique et x_b le déplacement mesuré entre l'objet piégé et le centre du piège. Ces mesures de forces peuvent être utilisées pour sonder à l'échelle microscopique les propriétés mécaniques des fluides (Weigand et al. 2017; Tassieri et al. 2010; Meyer et al. 2006), mais aussi celles d'objets viscoélastiques en solutions comme les cellules (Dao, Lim, and Suresh 2003; Sleep et al. 1999; Nawaz et al. 2012; Hénon et al. 1999; Yao et al. 2009). L'imposition d'un mouvement contrôlé à un objet sonde, grâce au déplacement du piège optique, peut également servir à étudier les interactions créées par ce mouvement sur les autres objets environnants et les mécanismes de couplage hydrodynamique présents (Kotar et al. 2010; Hamilton and Cicuta 2018).

B) Le dispositif utilisé

Le dispositif que j'ai utilisé, développé par Christophe Blanc au laboratoire Charles Coulomb, est schématisé sur la figure Figure 30. L'ensemble des éléments le composant, décrits ci-dessous, est placé sur une table anti-vibration à amortissement mécanique (Workstation Series, Melles Griot).

Le laser. Afin de pouvoir analyser des solutions aqueuses et des matériaux biologiques avec un impact minimal du faisceau laser sur ces échantillons, la longueur d'onde du laser est de 1064 nm,

dans le proche infrarouge, avec 5 W de puissance maximale (1064 nm laser YLM 5W, IPG Photonics). Cette longueur d'onde correspond à un minimum d'absorption de l'eau. L'intensité du laser est contrôlée dans la gamme de 1 à 5W, mais celle reçue par l'échantillon peut descendre jusqu'au milliwatt. A l'aide d'une combinaison lame $\lambda/2$ / polariseur (avec λ la longueur d'onde de la lumière) et de filtres de densité optique 1, 2 et 3, l'intensité reçue est divisée respectivement par 10, 100 et 1000. Le faisceau laser est dirigé grâce à un jeu de miroirs et de lentilles vers un microscope optique (LEICA DMI 3000 B) équipé d'un objectif à immersion à huile de grossissement x100 et d'ouverture numérique 1,4. Le faisceau laser est ainsi focalisé par l'objectif pour former le piège optique dans le plan d'observation du microscope. Un capteur (SmartSensorTM Interface Module, COHERENT) relié à l'ordinateur, permet de mesurer en continu la puissance effective du laser au moment de son entrée dans le microscope. Dans nos expériences le laser est maintenu fixe et c'est l'échantillon qui se déplace.

La platine. Le microscope est muni d'une platine piézoélectrique XY (Nano-Bio100, MCL) d'une précision sous-nanométrique, sur laquelle est déposé et fixé l'échantillon. La platine est reliée à une carte FPGA puis un ordinateur permettant de contrôler de manière automatisée le déplacement de l'échantillon grâce à un programme en langage LabView développé par Christophe Blanc. La température étant un facteur important pour les propriétés de l'échantillon, l'extrémité d'un thermocouple peut être fixée sur le bord de l'échantillon pour mesurer en continu la température avec une précision de 0,1°C.

La caméra. Afin de mesurer le mouvement de la bille par rapport au centre du piège optique, le microscope est équipé d'une caméra CCD (Basler Scout-F). Cette caméra a une fréquence d'acquisition maximale de 60 images par seconde et ses pixels correspondent à une taille de 46 nm avec ce microscope et cet objectif. La caméra est reliée à une carte FPGA puis un ordinateur, et le même programme LabView permet d'effectuer des enregistrements vidéo automatisés. Le mouvement de la bille au cours du temps est obtenu par l'analyse de la vidéo en utilisant la méthode de corrélation d'images sous LabView avec une précision d'1/10 de pixel (1 pixel = 46,37 nm), soit environ 4 nm.

Interfaçage. La caméra et la platine sont pilotées grâce à une carte FPGA ('field-programmable gate array' en anglais ou réseau de portes programmables en français) qui permet la synchronisation des mouvements et des acquisitions.

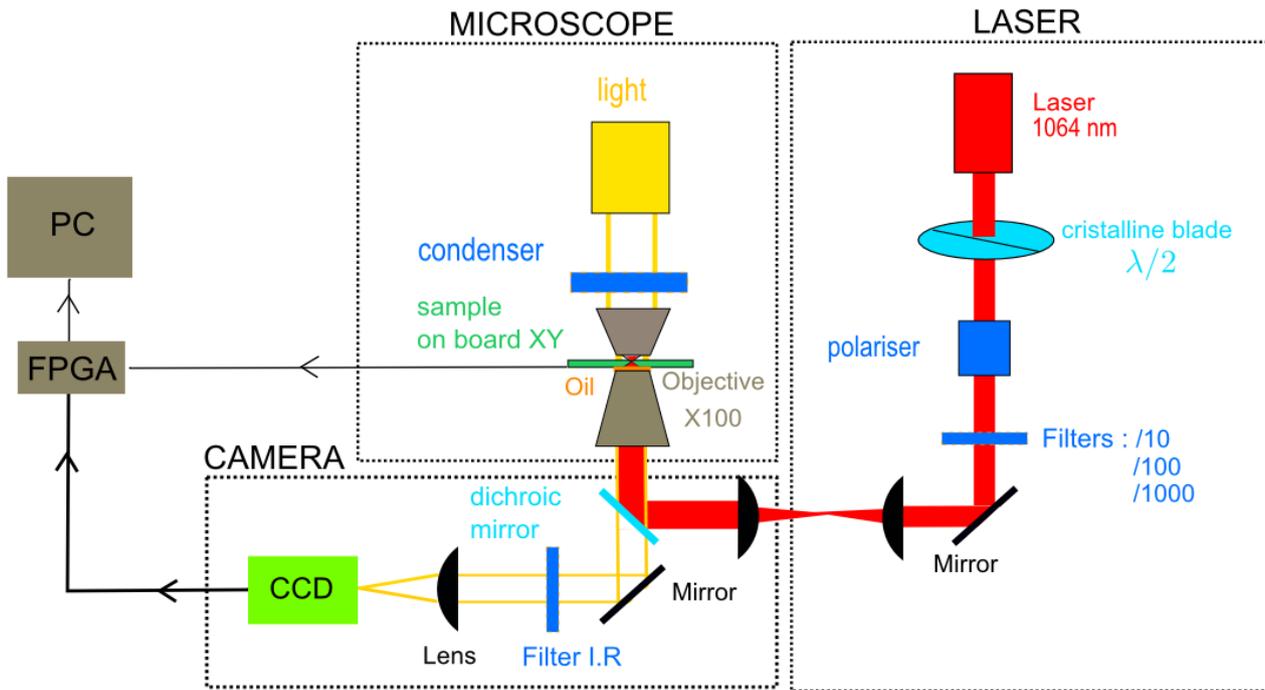


Figure 30 : Schéma de notre dispositif de pincettes optiques. Il y a cinq éléments majeurs : le laser (rouge), le microscope avec son objectif x100 (en gris), la platine du microscope (« board XY » en vert), la caméra (« CCD » dans le rectangle vert clair) et la carte FPGA reliée à l'ordinateur (« PC » dans le rectangle gris) permettant de contrôler la caméra et la platine grâce à une interface programmée sous LabView.

I.2.2.3.2. Détermination de la raideur du piège optique

Le piège optique peut être assimilé à un ressort. Il possède une raideur k_{OT} qui dépend de la puissance du faisceau laser mais aussi de la taille et du matériau piégé. Afin de conserver l'homogénéité de k_{OT} sur l'objet piégé il faut privilégier un objet homogène et isotrope, d'où l'utilisation de microparticules sphériques. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour déterminer k_{OT} (Neuman and Block 2004a). Nous en avons utilisé deux qui vont être décrites ci-dessous.

Méthode 1. La première méthode, utilise le mouvement de la bille dans le piège x_b sous l'effet de l'agitation thermique, soit le mouvement brownien. Le piège optique a une énergie potentielle E que l'on peut exprimer comme suit :

$$E = \frac{1}{2} k_{OT} x_b^2$$

D'après la loi de distribution de Boltzmann, le mouvement brownien dans le piège optique a une distribution $p(x) = A \exp\{-E/k_b T\}$, avec A une constante, k_b la constante de Boltzmann et T la température. Le mouvement brownien de la bille dans le piège est enregistré sur des temps suffisamment longs (10 min) et un ajustement gaussien de sa distribution $p(x) = B \exp\{-2x_b^2/w^2\}$

est appliqué, avec B l'amplitude et w l'écart type de la gaussienne (Figure 31). Ce qui nous permet de définir k_{OT} comme :

$$k_{OT} = \frac{4 k_b T}{w^2}$$

Cette méthode a l'avantage de permettre de calibrer k_{OT} dans le fluide même, dans les conditions précises de chaque mesure (avant ou après l'acquisition), et d'être indépendante des propriétés viscoélastiques du fluide. La raideur ainsi déterminée prend donc en compte la taille de la bille, l'indice optique du milieu et la différence avec celui de la bille, l'épaisseur d'échantillon traversé ou encore la présence d'impuretés sur le chemin optique. Elle est donc à privilégier quand le mouvement brownien est détectable pour la puissance du laser utilisée.

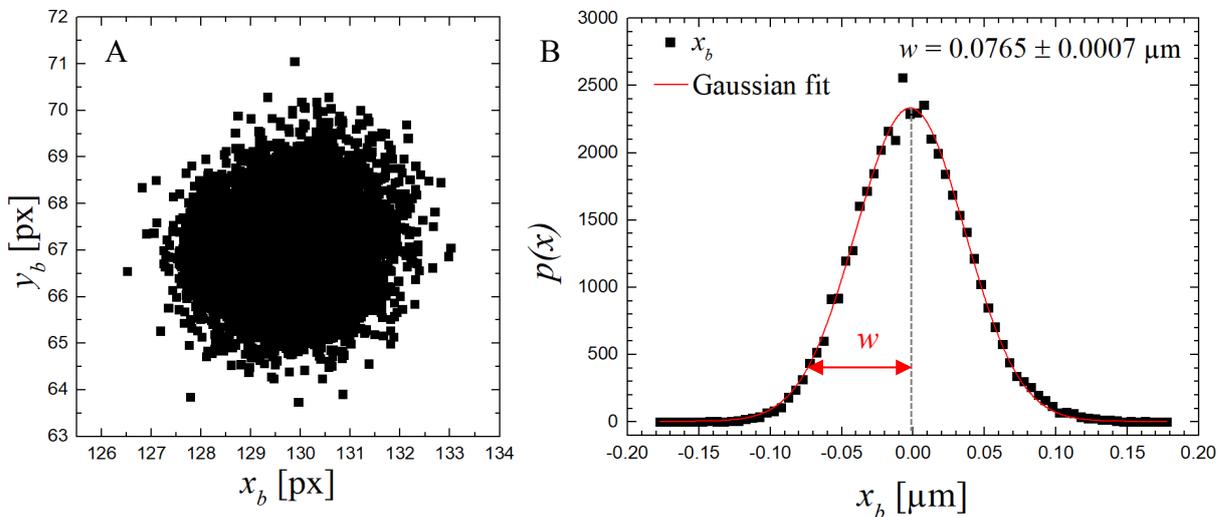


Figure 31 : Détermination de la raideur du piège optique grâce au mouvement brownien de la bille dans le piège. A) Déplacement de la bille piégée sur le plan xy sous l'effet de l'agitation thermique. La distribution doit être isotrope dans le cas d'un piège homogène. Les déplacements sont exprimés en pixels sans recentrage sur la position du piège. B) Distribution $p(x)$ du déplacement de la bille x_b par rapport au centre du piège optique. La ligne rouge représente l'ajustement gaussien appliqué, avec w l'écart type (double flèche rouge).

Méthode 2. Lorsque le mouvement brownien n'est pas détectable, soit pour des fluides très viscoélastiques, soit dans le cas d'une puissance du laser plus importante, une deuxième méthode est employée. Nous ne mesurons plus la raideur du piège in situ mais nous calibrons le piège dans un autre fluide de mêmes caractéristiques optiques, mais Newtonien, de viscosité η connue. Dans ce fluide Newtonien, une bille est piégée et un déplacement d'amplitude A à vitesse constante V est appliqué à la platine (Figure 32A). L'équivalence entre la force visqueuse de Stokes et la force du piège optique donne : $6\pi\eta aV = k_{OT}x_b$, avec a le rayon de la bille, et permet de déterminer k_{OT} , tous les autres paramètres de l'équation étant connus ou mesurables. Cette mesure est effectuée pour différentes valeurs de la puissance du laser en adaptant la vitesse V et l'amplitude A du déplacement pour que le déplacement de la bille x_b reste détectable malgré l'augmentation de la raideur k_{OT} du

piège optique (Figure 32). La relation linéaire entre la puissance utilisée et k_{OT} et la détermination de la droite passant par les points $k_{OT}(P)$, permet de déterminer la pente et l'ordonnée à l'origine qui seront utilisées par la suite dans nos mesures afin d'obtenir k_{OT} . Pour cette calibration du piège il faut un milieu d'indice optique le plus proche possible de celui du fluide analysé et avec les mêmes billes (taille et matériau) afin de rester dans des conditions de piège optique au plus près de celles des mesures dans le mucus. Dans le cas du mucus, avec un indice optique de $1,336 \pm 0,001$ à température ambiante, contenant principalement de l'eau d'indice optique de $1,332 \pm 0,001$ à la même température, le choix de l'eau est le plus pertinent. La Figure 32 montre le résultat de la calibration dans l'eau avec une bille de résine de mélamine carboxylée de $3 \mu\text{m}$ de diamètre, la plus utilisée dans nos mesures de micro-rhéologie active. Elle a été faite dans de l'eau pure, sans impuretés et pour une distance à la lamelle de 30 à $50 \mu\text{m}$. Cette deuxième méthode n'étant pas faite dans le fluide à analyser, dans les conditions exactes de l'expérience (température, obstacles sur le chemin optique dus à la présence d'impuretés, épaisseur d'échantillon traversé, ...), quelques précautions doivent être prises pour valider son application. Ces précautions et vérifications sont détaillées dans le supplément de l'article 2.

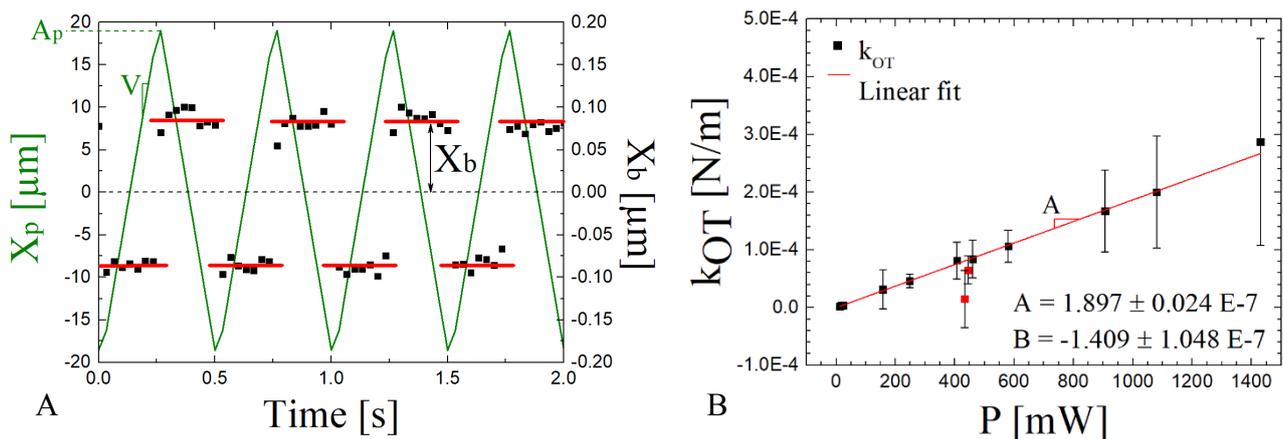


Figure 32 : Calibration dans l'eau de la raideur du piège optique en fonction de la puissance du laser pour une bille de résine de mélamine carboxylée de $3 \mu\text{m}$ de diamètre. A) Déplacement de la bille x_b enregistré (carrés noirs) pour un signal triangulaire imposé à la platine (ligne verte) à vitesse constante $\pm V$ et d'amplitude A_p . Les segments rouges représentent la position moyenne $\pm x_b$. B) La raideur du piège optique k_{OT} en fonction de la puissance du laser P (carrés noirs). Les barres d'erreur sont estimées à partir de l'incertitude sur la détermination de x_b . La ligne rouge est l'ajustement linéaire appliqué dont les paramètres A et B serviront à calculer k_{OT} pour nos mesures dans le mucus. Les deux carrés rouges sont des valeurs de k_{OT} qui ont été exclus de l'ajustement.

I.2.2.3.3. Micro-rhéologie active

A) Principe

Comme expliqué plus haut, les pincettes optiques permettent de mesurer des forces F à partir de l'écart x_b entre l'objet piégé (la bille) et le centre du piège optique. Cette force est équivalente à

celle exercée par le fluide. D'après l'analyse de Shundo et al et d'autres auteurs (Shundo et al. 2013; Tassieri et al. 2010; Neuman and Block 2004b), la force exercée par le fluide peut être décomposée en trois contributions : la force d'inertie, la force visqueuse et la force élastique ; comme illustrée dans la relation suivante :

$$F = -k_{OT} x_b = m\ddot{x}_b + 6\pi a\eta(\dot{x}_b - \dot{x}_s) + k_{el}(x_b - x_s) \quad [Equation 1]$$

avec x_b et x_s respectivement le déplacement de la bille par rapport au centre du piège et le déplacement imposé à la platine (l'échantillon), k_{OT} la raideur du piège optique, m et a respectivement la masse et le rayon de la bille, et enfin η et k_{el} respectivement la viscosité et l'élasticité du fluide. La force d'inertie étant négligée devant les forces visqueuse et élastique, elle ne sera donc pas prise en compte dans le reste du développement. Le déplacement de la platine x_s imposé et celui de la bille x_b sont sinusoïdaux dans nos mesures et sont écrits en notation complexe, soient $x_s = x_s^* = A_s e^{i\omega t}$ et $x_b = x_b^* = A_b e^{i\omega t} e^{-i\varphi}$ avec A_s et A_b les amplitudes respectives du déplacement de la platine et de la bille, φ le déphasage entre les signaux, ω la fréquence imposée et i le nombre complexe. En intégrant la notation complexe et en appliquant les relations de rhéologie linéaire, on peut définir le module viscoélastique $G^* = \tau^*/\gamma^*$, avec τ^* la contrainte et γ^* le taux de déformation, afin d'en extraire le module élastique G' et visqueux G'' . Dans le cas des pincettes optiques, on applique un déplacement Δx d'une bille immergée dans l'échantillon et on mesure la force F exercée sur cette bille de rayon a . On obtient donc la relation suivante :

$$G^* = \frac{\tau^*}{\gamma^*} = \frac{F}{6\pi a \Delta x} = \frac{k_{OT} x_b^*}{6\pi a (x_b^* - x_s^*)} = \frac{k_{OT} A_b e^{-i\varphi}}{6\pi a (A_b e^{-i\varphi} - A_s)} = G' + iG'' \quad [Equation 2]$$

Les parties réelle et imaginaire de l'équation permettent d'exprimer G' et G'' :

$$G' = \frac{k_{OT}}{6\pi a} \frac{A_b^2 - A_s A_b \cos\varphi}{A_b^2 + A_s^2 - 2 A_b A_s \cos\varphi} \quad [Equation 3]$$

$$G'' = \frac{k_{OT}}{6\pi a} \frac{A_s A_b \sin\varphi}{A_b^2 + A_s^2 - 2 A_b A_s \cos\varphi} \quad [Equation 4]$$

B) Mesures sur le mucus prélevé

Afin d'éviter les effets de bords, les mesures sont réalisées à 30 μm minimum de la lame ou de la lamelle. Pour tenir compte de l'hétérogénéité du mucus, au minimum 5 mesures sont effectuées par échantillon, réparties en différents points sur le plan horizontal de la chambre d'observation, nommés localisation par la suite. Une fois une microbille piégée et isolée avec les pincettes optiques, un déplacement sinusoïdal est imposé à la platine. Le déplacement imposé à la platine A_s est faible afin de maintenir la bille piégée et de travailler un régime linéaire pour le fluide analysé (Figure 33).

On vérifie avant chaque mesure que le déplacement de la bille dans l'échantillon est détectable pour la puissance du laser choisie et la gamme de fréquence appliquée. La puissance de notre piège est donc adaptée à la viscoélasticité du fluide analysé. Un minimum de 10 cycles par fréquence est imposé et enregistré. La gamme de fréquence explorée est entre 0,09 et 1,1 Hz pour la majorité des expériences réalisées. Il est possible d'explorer des fréquences plus basses, mais pour les fréquences plus hautes, au-delà de 1 Hz, des problèmes d'inerties se posent sur le déplacement de la platine. L'amplitude réelle de son déplacement diminue et elle peut varier au cours du temps. L'amplitude de notre signal imposé étant faible ($1\ \mu\text{m}$), nous avons pu atteindre 50 Hz avec fiabilité (pas de fluctuation du signal imposé). Cela a été testé sur 6 échantillons de mucus BEGM. Pour travailler à des fréquences supérieures à 50 Hz il faut pouvoir déplacer le laser et non la platine. Cela est possible en ajoutant au dispositif une paire de déflecteurs acousto-optiques (AA optoelectronic) qui permettent de contrôler les oscillations du piège optique. Mais cela diminue la puissance effective du laser et donc le potentiel du piège d'un facteur 2 à 3. Nous n'avons pas utilisé ce dispositif pour nos mesures sur le mucus et nous avons limité nos mesures à 50 Hz. Plus spécifiquement, les différents mucus analysés ayant des caractéristiques et contraintes différentes, nous avons adapté la mesure à chaque type d'échantillon comme détaillé ci-dessous.

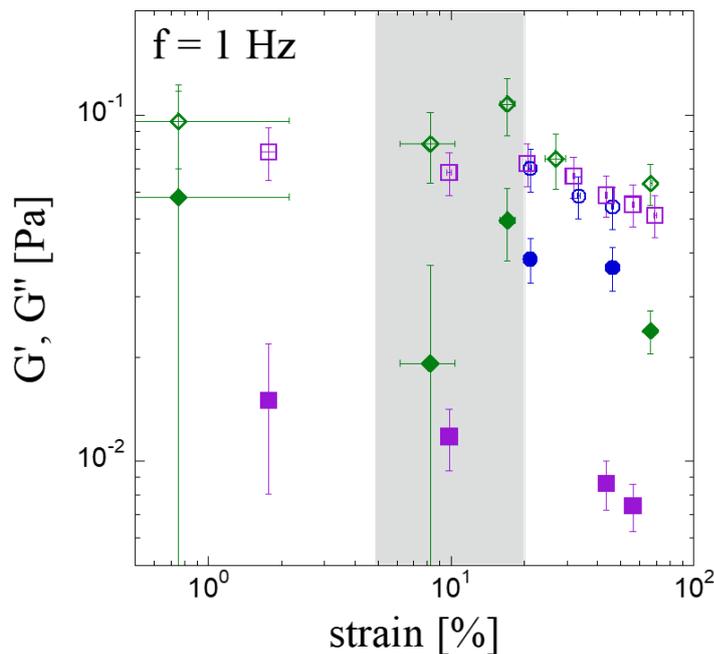


Figure 33 : Détermination du régime linéaire du mucus en micro-rhéologie active. Le module élastique G' (symboles pleins) et le module visqueux G'' (symboles vides) sont représentés en fonction de la déformation γ , définie comme l'amplitude de la platine A_s moins celle de la bille A_b par rapport au diamètre de la bille d , soit $\gamma = (A_s - A_b)/d$. La plage grisée représente la gamme de déformation imposée au mucus à 1 Hz avec $A_s = 1\ \mu\text{m}$ sur tous nos échantillons de mucus BEGM. Les trois symboles et couleurs représentent trois mesures effectuées à différentes localisations dans un échantillon de mucus. Les mesures sont réalisées dans du mucus BEGM prélevé avec des billes de résine de mélamine carboxylée ($d=3\ \mu\text{m}$).

Le mucus BEGM. Nous avons observé que sur l'ensemble des mucus prélevés sur les cultures BEGM (N= 26 patients), ce mucus est relativement abondant, faiblement viscoélastique, et très peu concentré en débris cellulaires (Figure 34A). Il est analysé en imposant un déplacement $A_s = \pm 1 \mu\text{m}$ avec des puissances du faisceau laser entre 20 et 100 mW. La calibration de la raideur du piège k_{OT} se fait systématiquement pour chaque mesure grâce au mouvement brownien.

Le mucus PneumaCult. Ce mucus est disponible en très faible quantité. Il est également beaucoup plus viscoélastique que le BEGM et très chargé en débris cellulaires (Figure 34C ou figure S1 dans le supplément de l'article 2). Le déplacement imposé est $A_s = \pm 0,5 \mu\text{m}$ avec des puissances du faisceau laser de l'ordre de 1W. Le mouvement brownien n'étant pas détectable, la détermination de k_{OT} se fait grâce à une calibration préalablement réalisée dans l'eau (indice optique très proche du mucus) pour la bille utilisée (résine de mélamine carboxylée de $3 \mu\text{m}$ de diamètre) permettant de connaître k_{OT} pour chaque valeur de puissance du faisceau laser (voir méthode plus haut dans la détermination de k_{OT} (I.2.2.3.2.)). Cette détermination par calibration sera utilisée pour tous les échantillons autres que le mucus BEGM.

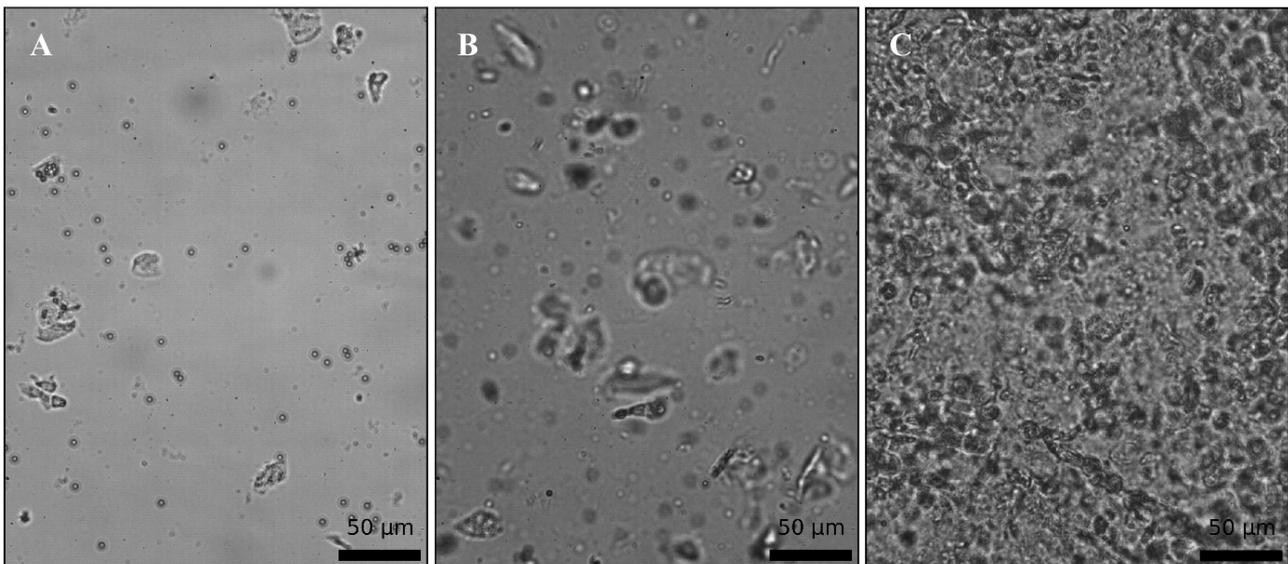


Figure 34 : Illustration de la présence d'impuretés et de débris cellulaires dans les échantillons de mucus. A) Mucus BEGM prélevé (présence similaire pour le mucus BEGM sur la culture loin de l'épithélium). B) Présence, reproduite dans de l'eau, des débris cellulaires dans le mucus BEGM sur la culture au plus près de l'épithélium (similaire pour deux mucus ex vivo (patients 5 et 7)). C) Mucus PneumaCult prélevé (présence similaire dans le mucus sur la culture PneumaCult, quel que soit la distance au tissu, et dans les cinq autres mucus ex vivo). Barre d'échelle : $50 \mu\text{m}$.

Le mucus ex vivo. Ces échantillons sont disponibles en très faible quantité ($\sim 15 \mu\text{L}$) et ils sont très hétérogènes, au sein d'un même échantillon et entre les différents prélèvements (N=7), notamment en termes de concentration en débris cellulaires (Figure 34B et C) et en viscoélasticité. Dans les zones de plus forte viscoélasticité, que nous appelons cas I, chargé en amas de débris cellulaire, comme illustré sur la Figure 35A (ou figure S6B dans le supplément de l'article 2), le déplacement imposé

est $A_s = \pm 0,5 \mu m$ avec des puissances du faisceau laser de l'ordre de 1 W. Alors que dans des zones de moins forte viscoélasticité, que nous appelons cas II, avec peu ou pas de débris cellulaire comme illustré sur la Figure 35B (ou figure S6C dans le supplément de l'article 2), le déplacement imposé est $A_s = \pm 1 \mu m$ avec des puissances du faisceau laser de l'ordre de 100 mW.

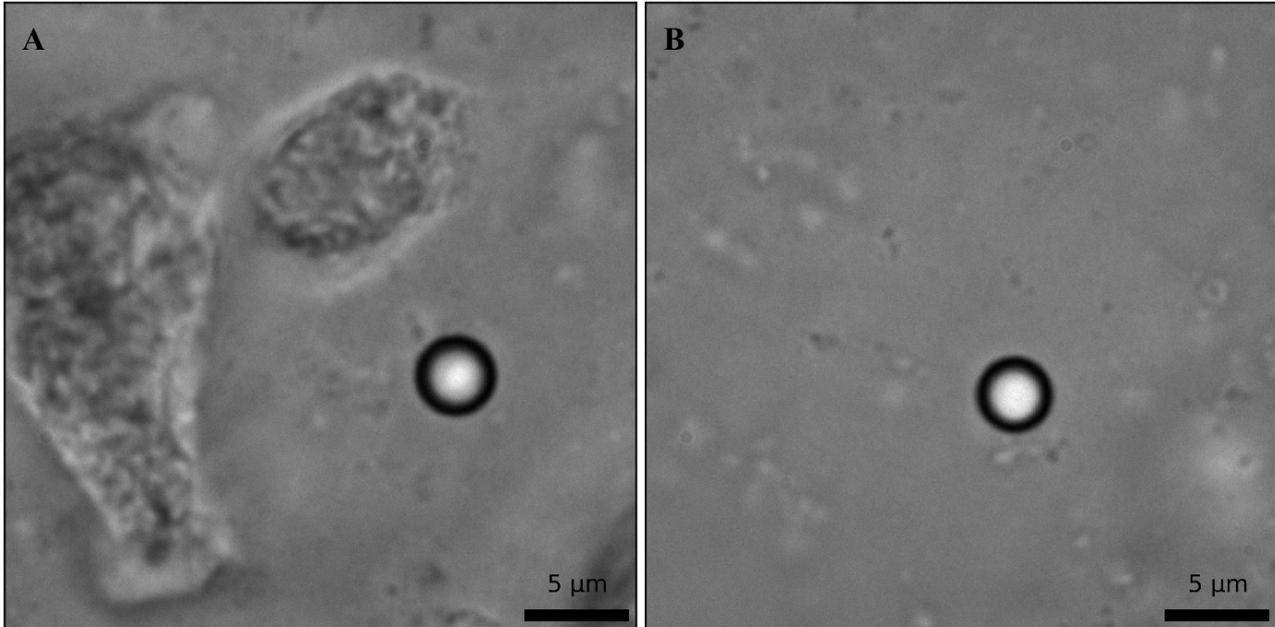


Figure 35 : Illustration de l'hétérogénéité de la concentration en débris cellulaire dans le mucus *ex vivo* et des deux cas de configuration de la bille lors de la mesure de micro-rhéologie : A) le cas I lorsque la bille est proche d'un amas (entre 5 et 15 μm) est que des forces de rappel sont ressenties lorsque la bille est éloignée de plus de 20 μm du débris le plus proche ; B) le cas II lorsque la bille est loin des gros débris et amas cellulaires (plus de 30 μm) et qu'il est possible de la déplacer librement sans ressentir de force de rappel sur plus de 30 μm . Barre d'échelle : 5 μm .

Les mucus synthétiques. Les mucus synthétiques présentent plusieurs concentrations et donc viscoélasticités. En dessous de 0,5 % de concentration, les mêmes valeurs des paramètres que pour le mucus BEGM ont été appliqués. A partir de 0,5 % de concentration, ce sont les valeurs utilisées pour le mucus PneumaCult qui ont été choisies. Les échantillons de mucus synthétique, de concentrations au-delà de 1%, n'ont pu être analysés car la puissance maximale de nos pincettes optiques de 2,9 W n'a pas permis de maintenir la bille dans le piège optique, même pour des très faibles déplacements de $A_s = \pm 0,2 \mu m$. Les échantillons sont trop viscoélastiques pour les caractéristiques de nos pincettes.

C) Mesures du mucus sur la culture

Afin de mesurer les propriétés rhéologiques du mucus au plus près de l'épithélium, dans les conditions les plus réalistes et sans biais induits par un prélèvement, nous avons mis au point un

dispositif expérimental permettant d'étudier en micro-rhéologie la couche de mucus directement sur l'épithélium, grâce à des pincettes optiques (voir préparation de l'échantillon I.2.2.3.6.). En effet, nous avons constaté que lors du prélèvement du mucus sur les cultures d'épithélium, une fine couche de mucus plus opaque, viscoélastique et adhésive reste toujours collée au tissu. Cette couche très adhésive est ardue à prélever sans diluer le mucus ou arracher les cellules de l'épithélium.

Les mesures se font tant que le tissu est vivant, c'est à dire dans un délai de 3h maximum. Globalement, les cellules ciliées s'arrêtent de battre au bout de 30 minutes, des vésicules apparaissent à partir de 30 minutes voire 1 heure et les cellules commencent à se décrocher du filtre au-delà de 3h-3h30. Une comparaison entre deux chambres d'observation préparées (Figure 36) (deux tissus issus du même patient), dont l'une laissée dans l'incubateur (observée toutes les 30 minutes au microscope) et l'autre analysée avec les pincettes optiques, montre des temps de dégradation équivalents. La dégradation est donc majoritairement due à la préparation de la chambre et non à la présence du piège optique. Nous avons vérifié pour la culture BEGM que les valeurs de viscoélasticité sont équivalentes pour une même valeur de h au début de l'expérience et à la fin, après 2h30.

Les mesures de viscoélasticité dynamique sont réalisées en appliquant à la platine le même mouvement sinusoïdal que décrit précédemment. La durée de vie de l'épithélium dans notre chambre d'observation étant limitée, 5 cycles sont imposés et enregistrés pour seulement 5 valeurs de fréquence réparties de manière logarithmique entre 0,09 et 1,1 Hz afin d'économiser du temps et ainsi augmenter le nombre de mesures. Le déplacement imposé à la platine est de $A_s = \pm 1 \mu m$ pour les cultures BEGM et $A_s = \pm 0,5 \mu m$ pour les cultures PneumaCult avec des puissances du laser respectives entre environ 100 mW loin du tissu et 1 W au plus proche de l'épithélium BEGM et environ 1 à 2,5 W indépendamment de la distance au tissu PneumaCult. Pour sonder toute l'épaisseur de la couche de mucus, une bille est d'abord piégée près de la lamelle, c'est à dire en bas de la chambre d'observation illustrée sur la Figure 36 (ou Figure 1 de l'article 2), puis remontée petit à petit jusqu'au tissu en essayant d'effectuer une mesure tous les 10 μm . Le piège optique repousse la bille lorsqu'elle sort de son centre, préférentiellement dans la direction du faisceau laser, soit vers le haut donc vers le tissu dans notre dispositif. Dû à l'effet conjoint de la viscoélasticité, qui augmente à proximité de l'épithélium, et du piège optique qui repousse la bille vers le haut, il est très difficile une fois la bille proche du tissu de l'en retirer. L'exploration se fait donc toujours en commençant au plus loin du tissu et en se dirigeant vers lui. Un minimum de 15 mesures sont réalisées sur chaque échantillon pour différentes hauteurs h à l'épithélium et réparties sur minimum 3 localisations du plan horizontal xy afin de sonder l'hétérogénéité de la couche de mucus. Cela correspond dans l'idéal à trois billes différentes (une pour chaque localisation sur le plan xy) avec 5 mesures en fonction de la distance au tissu h pour chaque bille avec un pas de 10 μm . Dans la pratique il est fréquent de perdre la bille au cours de sa migration vers l'épithélium et l'exploration est alors incomplète. Une nouvelle bille proche de la lamelle et en une autre localisation est recherchée et piégée afin de commencer une nouvelle série. Nous avons donc souvent plus de trois billes (localisations) et rarement l'échantillonnage visé d'un point tous les 10 μm .

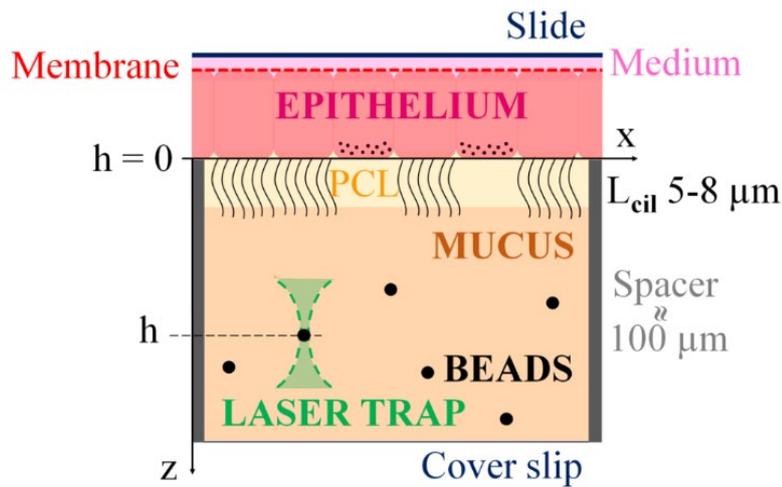


Figure 36 : Schéma de la chambre d'observation élaborée pour mesurer la viscoélasticité du mucus directement sur la culture en fonction de la distance au tissu. Les mesures sont réalisées en micro-rhéologie active avec un piège optique.

Nous avons vérifié l'effet du large déplacement imposé ($\sim 10\mu\text{m}$) de la bille sur la viscoélasticité mesurée (Figure S5 du supplément de l'article 2). Cet effet n'excède pas 35% de perte sur la viscoélasticité du mucus après 3 minutes d'attente. Nos mesures sont toutes effectuées 3 minutes après le déplacement de la bille afin de laisser l'échantillon relaxer. Le faisceau laser augmentant localement la température de l'échantillon, à raison de 1°C maximum tous les 100 mW (Català et al., 2017; Liu et al., 1995; Peterman et al., 2003; Shundo et al., 2013), nous avons évalué l'effet de la température sur la viscoélasticité du mucus BEGM, sur un écart de 20 à 27°C . Cet impact reste faible, notamment en comparaison des variations observées en fonction de la distance au tissu, avec une diminution des modules viscoélastiques de 50% (Figure S4 en supplément de l'article 2). Lors de l'expérience sur la culture BEGM, les températures peuvent varier de 20 à 32°C en fonction de la puissance du laser.

Le déplacement vertical est mesuré grâce aux graduations du microscope ($2\mu\text{m}$ par graduation). En tenant compte du chemin optique réfracté à l'interface entre la lamelle et le mucus on obtient la relation suivante :

$$h = h_g \frac{n_v}{n_m}$$

avec h la distance au tissu ($h = 0$ à son niveau), h_g le déplacement effectué grâce à la graduation fine du microscope, n_v l'indice optique de la lamelle, c'est-à-dire celui du verre de 1,5 et n_m celui du mucus de 1,336 mesuré grâce à un réfractomètre (soit quasiment celui de l'eau de 1,333 à la même température ambiante). La bille étant déplacé vers le tissu, les mesures commencent près de la lamelle

et le déplacement vertical est d'abord renseignée par rapport à celle-ci, notée h_c . Une fois l'épithélium atteint, à la distance h_t de la lamelle, la hauteur h est déterminée : $h = h_t - h_c$.

La détermination de la raideur du piège optique k_{OT} se fait grâce à une calibration préalablement réalisée dans l'eau (méthode 2). Nous avons vérifié que la distance à la lamelle et la présence de débris cellulaires proche du tissu a peu d'impact sur k_{OT} pour une bille et une puissance du laser données (Figures S2 et S3 dans le supplément de l'article 2).

I.2.2.3.4. Mesures de force d'adhésion

Au cours de mon projet, j'ai mesuré les forces d'adhésion induites par la présence du mucus BEGM entre une microbille et une paroi avec deux approches différentes.

La première approche consiste à mesurer la force de rappel exercée par le mucus sous la traction à large amplitude d'une bille piégée, préalablement adhéree à une paroi par un contact prolongé. La traction est réalisée en imposant un déplacement à la platine d'amplitude $A = \pm 10 \mu\text{m}$ et à vitesse constante $V = 0,88 \mu\text{m/s}$ (schéma de la Figure 6A de l'article 1). Le déplacement x_b de la bille par rapport au centre du piège est enregistré au cours du temps grâce à une acquisition vidéo à 30 images par seconde. Afin de minimiser les risques de rupture de l'adhésion au cours du déplacement imposé à large amplitude, nous avons cherché à maximiser la force d'adhésion du mucus entre la bille et une surface. Une bille de silice de $4,6 \mu\text{m}$ de diamètre est choisie et mise en contact sur la surface de verre de la lamelle pendant minimum 10 minutes. Pour éviter le frottement de la bille contre le verre et limiter les effets de bord sur l'écoulement du fluide au cours du déplacement, la bille est décrochée de la lamelle en montant lentement de quelques micromètres à forte puissance du laser (environ 2 W). Une fois la bille décollée, il faut vérifier que cette étape n'a pas complètement rompu l'adhésion entre la bille et la lamelle. Pour cela, la bille est déplacée horizontalement de plusieurs micromètres, à faible vitesse et à plus faible puissance laser (de l'ordre du 100 mW), pour vérifier que la bille est toujours liée à la paroi, c'est-à-dire qu'une force de rappel s'exerce dès qu'on s'éloigne d'un certain rayon de la zone d'adhésion. Si la bille est toujours liée, la mesure peut commencer en se positionnant à environ $10 \mu\text{m}$ verticalement de la lamelle le plus possible à la verticale du point d'adhésion initial. Pour toutes les mesures réalisées avec cette méthode, k_{OT} a été déterminé grâce à une calibration dans l'eau. Pour les puissances du laser utilisées, de l'ordre de 1 W, le mouvement brownien n'est plus suffisamment détectable pour mesurer k_{OT} directement dans le mucus BEGM dans les conditions exactes de la mesure de force.

La deuxième approche consiste à mesurer la force de rappel exercée par le mucus sous une traction, sans déplacement de la platine, d'une bille piégée. Elle permet de mesurer s'il y a des phénomènes de relaxation ou de rupture de l'adhésion au cours du temps pour une déformation donnée. Le piège optique est maintenu à une distance fixe d d'une paroi et la tension exercée au cours

du temps par le mucus sur la bille piégée est enregistrée. C'est une mesure préliminaire qui illustre les comportements adhésifs du mucus sous une tension continue. Pour améliorer cette expérience, il faudrait mettre en place une boucle de rétroaction pour travailler à force constante. Dans notre approche, la paroi est verticale, en colle UV (voir préparation des échantillons). Une microbille de silice de 4,6 μm de diamètre est piégée puis amenée et maintenue contre la paroi environ une minute. Après ce temps d'adhésion, la bille est tirée très lentement à l'horizontale, sur l'axe x , avec une puissance du laser comprise entre 10 et 30 mW. Lorsqu'une force de rappel visible commence à s'exercer sur la bille, mais qu'elle est toujours piégée, la traction est arrêtée à cette distance d de la paroi. Un enregistrement vidéo de l'évolution du mouvement x_b de la bille par rapport au centre du piège optique est débutée dans les 10 secondes qui suivent (schéma de la Figure 6B de l'article 1). La raideur du piège optique k_{OT} est déterminée par la méthode 2.

I.2.2.3.5. Analyse des données

Les signaux du déplacement imposé et du mouvement de la bille obtenus par l'analyse d'image de la vidéo, sont analysés grâce au programme Origin. Dans le cas de la micro-rhéologie active, l'analyse a été automatisée grâce à un programme écrit dans Origin. Pour chaque point de mesure, à un déplacement A_s et une fréquence f imposées à la platine, tous les cycles acquis sont superposés sur un cycle et un ajustement sinusoïdal $y = A \sin(2\pi f x + \varphi) + c$ est appliqué, avec A l'amplitude, f la fréquence, φ la phase et c le centre de la sinusoïde. L'ajustement est appliqué sur les deux signaux, celui de la platine et celui de la bille. En tenant compte des conversions pixels-micromètres et images-temps, les paramètres des ajustements nous permettent d'accéder aux valeurs nécessaires au calcul des modules élastique G' et visqueux G'' comme le montrent les équations définies plus haut. Dans un premier temps les modules sont calculés sans le facteur $k_{OT}/6\pi a$ puis en renseignant le rayon de la bille a utilisée et la raideur du piège optique k_{OT} correspondant à la mesure nous pouvons calculer la valeur finale de G' et G'' . Des points ne sont pas retenus là où le signal de la bille n'est pas parfaitement sinusoïdal ou s'il y a des sauts brusques de son déplacement qui montrent qu'elle sort du piège. Les paramètres G_0 et α de la loi de puissance des modules viscoélastiques G' et G'' en fonction de la fréquence f sont également déterminés en appliquant un fit de loi de puissance de formule $G = G_0 f^\alpha$. Dans le cas des mesures de force rien n'est automatisé et le signal du mouvement de la bille est converti en force en connaissant la raideur du piège optique k_{OT} correspondant à la mesure et en tenant compte des facteurs de conversions pixels-micromètres et images-temps.

I.2.2.3.6. Préparation des échantillons

La micro-rhéologie nécessite de disposer de microbilles sondes dans les échantillons. Le choix des microparticules et de leur concentration volumique dans l'échantillon va être discuté ci-dessous pour les différents types de mesures effectués. Dans tous nos expériences, nos échantillons sont placés

entre une lame de verre d'un millimètre d'épaisseur, préalablement découpée à la bonne dimension pour être fixée sur la platine de notre dispositif, et une lamelle de verre optique de 22 x 22 mm² et environ 150 µm d'épaisseur (#1).

A) Pour la micro-rhéologie active :

Le mucus BEGM prélevé.

Au cours de mon projet, j'ai utilisé quatre types de microbilles, de taille et de composition différentes : des billes de résine de mélamine de 5 µm de diamètre (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich), des billes de silice SiO₂ de 4,56 µm de diamètre (Bangs Laboratories Inc), des billes de résine de mélamine carboxylées (terminaison -COOH sur l'enrobage) de 3 µm de diamètre (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) et des billes de silice de 0,96 µm de diamètre (Bangs Laboratories Inc). Les billes sont préalablement soniquées et lavées dans de l'eau purifiée par centrifugation puis stockées à 4°C dans une solution d'eau pure avec une concentration de 0,4% en volume. Par la suite, comme la micro-rhéologie sur le mucus a montré peu de différence de comportement entre les quatre billes (Figure S15 du supplément de l'article 1), seules les microparticules de mélamine carboxylées de 3 µm de diamètre sont utilisées.

Lors de la préparation de nos échantillons, 100 µL de mucus est typiquement prélevé et placé dans un Eppendorf. L'ajout de la solution de billes (préalablement bien agitée au vortex pour réhomogénéiser la concentration en billes) ne doit pas induire une dilution de notre échantillon de plus de 1%, soit 1 µL ajouté (incluant la somme de toutes les solutions de billes) pour 100 µL de mucus. Une mesure en macro-rhéologie, réalisée sur un échantillon avant et après l'ajout des billes, nous a montré que la viscoélasticité macroscopique est exactement la même, c'est-à-dire que à cette échelle et sur ce type de mesure la dilution de 1% et la présence de 0,004% de microbilles n'a pas d'effets notables.

La concentration de billes dans nos échantillons est choisie afin d'être suffisante pour en trouver facilement mais avec des particules assez espacées pour qu'elles n'interagissent pas entre elles et qu'une seule bille soit potentiellement piégée, c'est-à-dire que la distance entre les billes est plus grande que le rayon d'influence du piège optique dans notre fluide pour des puissances du faisceau laser de l'ordre de 1 W. Après quelques tests, une concentration de 0,004% en volume a été choisie afin d'obtenir au minimum une bille tous les 100 x 100 x 100 µm³ de volume. Lorsque plusieurs microbilles sont incorporées dans notre échantillon leur concentration respective est ajustée afin de conserver une concentration totale de 0,004%.

Le mucus avec les billes est passé au vortex afin d'homogénéiser la concentration des particules dans l'échantillon. Il est ensuite placé entre lame et lamelle préalablement pégyllées (enduit de PEG, voir protocole en annexe A1) et espacées de 100 ou 175 µm grâce à deux espaceurs

(Polytéréphtalate d'éthylène, Mylar). Le volume d'échantillon est choisi afin de minimiser le volume d'air restant entre la lame et la lamelle (30 μL et 25 μL pour respectivement une épaisseur de 175 μm et 100 μm). Il est important de limiter la présence d'air et de remplir tout l'espace sous la lamelle afin d'éviter des phénomènes d'écoulement par la suite pouvant biaiser nos mesures de micro-rhéologie. La chambre d'observation est scellée rapidement avec de la colle UV (ThorLabs NOA81). Au cours de l'exposition aux UV, l'échantillon est protégé d'un morceau de papier d'aluminium. Le traitement des lames et lamelles est indispensable pour l'étude du mucus car à cause de ses propriétés adhésives, au bout de quelques minutes les billes au contact du verre y restent collées. Même l'utilisation du piège optique à la puissance maximum ne permet pas de les détacher. Cela est encore plus marqué avec les billes de silice.

Les mucus PneumaCult et *ex vivo* prélevés.

La préparation est très similaire à celle avec le mucus BEGM. Dans ce cas seules les billes de résine de mélanine de 3 μm de diamètre ont été utilisées. L'épaisseur de la chambre d'observation est fixée à 100 μm entre lame et lamelle pégylées. En revanche, le volume d'échantillon disponible étant très faible (~ 25 μL d'échantillon pour le mucus PneumaCult et ~ 15 μL pour le *ex vivo*) et très adhésif, le mucus se prélève difficilement à la micropipette. Il reste majoritairement collé à l'extérieur de l'embout de la micropipette, et lorsqu'il y rentre il est très difficile de l'en faire sortir. Le mucus est donc directement déposé sur la lame et son volume n'est pas connu avec précision. La solution de billes (0,5 μL) est directement ajoutée sur le volume d'échantillon sur la lame en remuant avec l'embout de la micropipette. Le facteur de dilution causé par l'ajout des billes n'est pas maîtrisé à cause de l'imprécision du volume de mucus mais n'excède pas 5%. Pour la même raison la concentration de billes dans l'échantillon dépasse les 0,004%. Elle est également beaucoup moins bien répartie dans le mucus mais nous permet tout de même d'effectuer nos mesures. La surface sous la lamelle non occupée par l'échantillon ou les espaceurs est rempli par de la colle UV.

Le mucus synthétique (solution de polysaccharides).

La préparation est la même que pour le mucus BEGM. Seules les microbilles de résine de mélamine carboxylées, de 3 μm de diamètre, sont utilisées et l'épaisseur entre lame et lamelle est de 100 μm pour tous les échantillons avec un volume déposé de 25 μL . Le traitement des lames et lamelles n'est pas nécessaire car ce mucus synthétique n'est pas aussi collant que le mucus.

Le mucus BEGM sur la culture.

Plusieurs tests ont été effectués afin de mettre au point la chambre d'observation, illustrée sur la Figure 36 (ou Figure 1 de l'article 2), permettant l'utilisation des pincettes optiques directement sur la culture. Une première approche consistait à placer la membrane sur une lamelle intégrée à une chambre fermée mais non scellée de plusieurs millimètres d'épaisseur afin de disposer dans la chambre d'une réserve de milieu nutritif et d'air. Cela permettait de garder le tissu vivant plusieurs heures voire jours en renouvelant le milieu. Mais le dispositif étant monté sur un microscope inversé, le faisceau laser doit traverser les pores de $0,4\ \mu\text{m}$ de diamètre de la membrane du filtre Transwell nécessaire à la culture cellulaire, avant d'atteindre les cellules puis la couche de mucus. La diffraction de la lumière causée par les pores de la membrane altère le piège optique et rend impossible l'utilisation des pincettes optiques. Il faut donc placer la membrane et le tissu à l'envers, la couche de mucus vers le bas sur la lamelle (Figure 36).

Pour cela des chambres scellées, de faible épaisseur, avec une réserve de milieu et d'air quasi inexistante, ont été testées. La durée de vie de l'épithélium dans ce type de dispositif est donc très limitée. Le choix de l'épaisseur entre la lamelle et le tissu et du type de cales choisies pour former cette espace est très important. L'épaisseur de la chambre ne doit pas excéder $150\ \mu\text{m}$, soit la distance de travail maximum possible avec l'objectif utilisé. Une épaisseur autour de $100\ \mu\text{m}$ est visée. Le premier choix de cales s'est porté sur des particules de silice anguleuses (débris de capillaire), de taille comprise entre 60 et $80\ \mu\text{m}$, disposées environ tous les $500\ \mu\text{m}$. Cette concentration a été obtenue en mélangeant les particules concentrées à 1% en volume dans de l'eau. Puis une goutte de $50\ \mu\text{L}$ de cette solution de billes est déposée sur une lamelle et laissée évaporée. Ce premier test a permis une hauteur homogène du tissu sur toute la surface, c'est-à-dire pas d'affaissement ou ondulation de la membrane. Mais en moins de 15 min après la préparation de la chambre, des vésicules apparaissaient et en moins de 2h le tissu se décollait complètement de la membrane, probablement en raison des bords anguleux des particules de silice qui pourraient constituer une agression pour le tissu. Un deuxième test avec des microbilles sphériques de polystyrène de $90\ \mu\text{m}$ de diamètre a été effectué. Mais les billes n'adhérant pas à la lamelle elles ne sont pas restées en place lors de la préparation de la chambre. Un troisième test a été effectué en utilisant un anneau circulaire (Grace Bio-Labs, 654004) de $13\ \text{mm}$ de diamètre et $120\ \mu\text{m}$ d'épaisseur collé à la lamelle en plaçant également au centre de l'anneau un petit morceau carré découpé au ciseau de $2\ \text{mm}$ de côté environ. La viabilité de l'épithélium sur ce montage a été plus grande, jusqu'à 3h, mais la hauteur de l'épithélium n'était pas constante avec notamment un affaissement entre l'anneau extérieur et le pilier central. Le quatrième et dernier test, conservé par la suite, a été fait en utilisant une micro-lithographie avec des piliers carrés de $100\ \mu\text{m}$ de côté et $100\ \mu\text{m}$ de haut espacés de $500\ \mu\text{m}$ préalablement réalisée (par Laura Casanellas du laboratoire Charles Coulomb). Cette micro-lithographie est ensuite moulée dans du PDMS. Le moulage en PDMS de nos piliers, c'est-à-dire avec l'épaisseur de $100\ \mu\text{m}$ pleine et juste les piliers vides, est ensuite rempli en colle UV (ThorLabs NOA81) sur une lamelle pour créer l'espaceur. La lamelle avec le moulage dessus est exposée aux UV minimum 10 min afin de permettre

la solidification complète des piliers, puis le moule de PDMS est retiré délicatement de la lamelle. La hauteur du tissu est ainsi homogène sur toute la surface et sa viabilité est comprise entre 2 et 3h. La lamelle étant recouverte de colle UV, cette méthode ne nécessite pas l'utilisation d'une lamelle traitée (PEG).

Les microbilles de résine de mélamine carboxylées, de 3 μm de diamètre, sont utilisées à une concentration de 0,004% en volume. Dans un Eppendorf, 50 μL de mucus prélevé moins d'une semaine avant la manipulation est ajouté à 0,5 μL de la solution de bille et homogénéisé au vortex. Sur une lame non traitée, 3 μL de milieu nutritif sont déposés. La membrane poreuse du puits soutenant le tissu est découpée au scalpel et déposée sur la lame au contact de la goutte de milieu. 20 μL du mucus préparé sont ensuite déposés sur le tissu. La lamelle avec les espaceurs utilisés sont placés sur l'ensemble lame / tissu / mucus. Pour limiter l'évaporation, la préparation doit être réalisée en moins de 5 min entre le découpage de la membrane et le dépôt de la lamelle. Toutes ces étapes sont réalisées sous une hotte. Pour finir la chambre est scellée à la colle UV (ThorLabs NOA81) puis exposée aux UV avec une feuille d'aluminium protégeant la surface du tissu. Les mesures sont réalisées immédiatement après la préparation de la chambre et tant que le nombre de vésicules qui apparaissent sur le tissu est limité et qu'il n'y a pas de cellules qui se décrochent de la membrane, soit environ 3h.

Le mucus PneumaCult sur la culture.

La méthode de préparation de la chambre est la même que pour celle sur la culture BEGM sauf que dans ce cas, comme il n'est pas possible de prélever du mucus, les billes sont ajoutées dans du milieu nutritif PneumaCult, avec le même protocole, et c'est donc du milieu et non du mucus qui est ajouté sur la culture. Pour ces échantillons, l'espaceur utilisé est toujours le moulage en colle UV de 100 μm d'épaisseur.

B) Pour les mesures de forces d'adhésion :

Dans le cas des mesures de forces d'adhésion il faut distinguer le cas d'une distance variable entre le point d'adhésion et le piège optique (schéma de la Figure 6A de l'article 1) et le cas d'une distance fixe (schéma de la Figure 6B de l'article 1).

Le cas d'une distance variable est réalisé avec la même préparation que pour la micro-rhéologie active, avec des billes de silice de 4,6 μm de diamètre dans l'échantillon qui sont celles entre les quatre qui maximise l'adhésion. Le déplacement imposé est entièrement sur l'axe x et l'adhésion se fait sur la lame ou la lamelle, donc sur l'axe verticale. Or les forces mesurées sont dans le plan xy, il manque la composante z tout aussi importante que la composante x (schéma sur la figure 6A de l'article 1).

Le cas d'une distance fixe est réalisé seulement sur le mucus BEGM dans une préparation dédiée. Notre dispositif de pincettes optiques nous permet de mesurer des forces seulement sur le plan xy . Il faut donc placer des parois verticales dans l'échantillon afin de maximiser l'adhésion sur la composante x . Un moulage en colle UV de piliers carrés de $100\ \mu\text{m}$ de côté et $100\ \mu\text{m}$ de haut espacés de $500\ \mu\text{m}$ est réalisé sur une lamelle non traitée. Dans $100\ \mu\text{L}$ de mucus, des billes de résine de mélamine de $5\ \mu\text{m}$ et des billes de silice de $4,56\ \mu\text{m}$ de diamètre sont disposées, en respectant la dilution maximum de 1% et la concentration finale en microbille de 0,004%. $20\ \mu\text{L}$ de l'échantillon de mucus avec les billes est déposé entre une lame pégylée et la lamelle préalablement préparée avec les piliers, puis la chambre est scellée à la colle UV.

I.2.3. Mesure de la composition biochimique du mucus

I.2.3.1. Mesure de la masse sèche avec un appareil d'Analyse Thermo-Gravimétrique (ATG)

Les volumes d'échantillons étant faibles et le mucus aqueux à près de 98% de la masse totale, une balance haute précision n'est pas suffisante pour mesurer la masse sèche restante avec la précision souhaitée de moins de 5% d'erreur relative. Un appareil d'ATG (METTLER TOLERO, TGA 1), équipé d'un contrôleur d'air (METTLER TOLEDO, Gas controller GC 200) et d'un refroidisseur (Huber Minichiller), le tout piloté par le logiciel STAR^e, a donc été choisi. La précision est de l'ordre du microgramme. Avec cet appareil, un volume de $20\ \mu\text{L}$ d'échantillon est suffisant. De plus la perte de masse est mesurée en continu au cours du temps ce qui permet également d'avoir accès au taux d'évaporation. Dans un creuset en alumine de $70\ \mu\text{L}$ de volume (METTLER TOLERO, ME-24123), bien propre, déjà déposé dans la chambre de l'appareil et taré, les $20\ \mu\text{L}$ sont déposés. Le plus rapidement possible, dès que la chambre de l'appareil est fermée, la valeur de la masse initiale m_i est relevée. La température initiale de la chambre est de 25°C . Une isotherme de 60°C est appliquée, atteint après une période de transition à 10°C par minute. Un flux d'azote est également appliqué avec un débit de $60\ \text{mL/s}$ pour avoir un air sec est faire complètement évaporer l'échantillon. En moins de 30 minute le plateau de la masse sèche m_f est atteint. La masse sèche dm exprimée en pourcentage est définie comme : $dm = 100 m_f / m_i$.

L'incertitude sur m_f est négligeable, de $1\ \mu\text{g}$, en revanche celle sur m_i est plus importante car elle comprend la masse évaporée entre le dépôt de l'échantillon et la lecture de m_i une fois la chambre de l'appareil fermée. Pour estimer cette incertitude, sur un échantillon, le temps entre le dépôt et la fermeture de la chambre a été chronométré. Puis la perte de masse subit à 25°C sans flux a été mesurée pour pouvoir extrapoler, par un fit linéaire, la courbe de la perte de masse en fonction du temps. La perte de masse pendant la fermeture de la chambre donne une incertitude relative de 0.05%. Cette incertitude a été appliquée par la suite à tous les échantillons.

Une fois la mesure terminée, le creuset avec le résidu sec est nettoyé au chalumeau.

I.2.3.2. Mesure du pH

Les volumes d'échantillon de mucus étant faibles, du papier pH (MACHEREY-NAGEL) a été utilisé avec une précision de 0,3. Les pH étant différents entre les différents types de mucus, pour obtenir cette précision de 0.3 deux gammes de papier ont été utilisées. Le papier de la gamme de 7,5 à 9,5 a servi pour le mucus BEGM, plus basique, et la gamme de 6,0 à 7,7 pour les mucus PneumaCult et « ex vivo ». Un volume de 10 μ L d'échantillon est prélevé pour la mesure du mucus BEGM et l'embout du papier est directement frotté contre les résidus de mucus adhérents sur les parois de l'Eppendorf pour la mesure du mucus PneumaCult et « ex vivo ». La couleur du papier pH doit tout de suite être relevée dès le dépôt de l'échantillon car le mucus s'évapore vite, surtout avec ce faible volume, et le pH devient plus basique rapidement.

I.2.3.3. Mesure de la concentration en électrolytes et protéines

Toutes les mesures de la teneur en protéines, sodium, potassium, chlorure et bicarbonate ont été réalisées par Véronique Chamel du CEA de Grenoble, à partir de 100 μ L d'échantillon envoyé, grâce à des analyseurs fournis par COBRAS INTEGRA à partir de 100 μ L de mucus.

La teneur en protéines est obtenue en utilisant l'analyseur « Total Protein Urine/CSF Gen.3 » (Roche Diagnostic). Brièvement, ce test nécessite la dilution de l'échantillon dans une solution alcaline (hydroxyde de sodium) contenant de l'EDTA (pour acide EthylèneDiamineTétraAcétique) qui va dénaturer les protéines et éliminer l'interférence des cations magnésium. Du chlorure de benzéthonium est ensuite ajouté à la solution. Il a la propriété de réagir avec les protéines en milieu alcalin. La réaction engendre une turbidité dans la solution qui est mesurée à 512 nm par l'analyseur et converti en concentration de protéines.

Le potassium, le sodium et le chlore sont mesurés ensemble grâce au module « ISE Indirect » (COBRA INTEGRA). Il repose sur la méthode ISE (pour Ion Selective Electrode), une mesure indirecte de la concentration d'un ion à partir de son activité en solution grâce à des électrodes sélectives. L'échantillon est dilué dans de l'eau pure.

Le bicarbonate est obtenu grâce à l'analyseur « Bicarbonate liquid » (COBRA INTEGRA). Brièvement, l'échantillon est mis en solution avec une enzyme, la PhosphoEnolPyruvate Carboxylase PEPC, une coenzyme la Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) sous forme réduite NADH, et un catalyseur la Malate DésHydrogénase MDH. L'acide PhosphoEnolPyruvate PEP est ajouté en dernier. Le principe de l'analyseur repose sur la réaction du bicarbonate avec l'acide PEP en présence de l'enzyme PEPC. Cette première réaction produit du phosphate et de l'oxaloacétate qui à son tour réagit avec la coenzyme réduite NADH grâce à la présence du catalyseur MDH. La diminution de NADH au cours de la réaction est mesurée grâce à la diminution de l'absorbance à 409 nm d'elle engendre. La vitesse de diminution de l'absorbance est directement proportionnelle à la présence

initiale de bicarbonate dans la solution et permet donc de remonter à sa concentration.

Pour chaque test, la concentration obtenue est ensuite reconvertie en concentration finale selon le volume initial d'échantillon en tenant compte du facteur de dilution opéré pour chaque analyseur.

I.2.4. Images de la structure par microscopie électronique à balayage (cryo-SEM)

Pour avoir un aperçu de la structure du mucus, des images par microscopie électronique à balayage sur du mucus cryogénisé (cryo-MEB ou cryo-SEM en anglais) ont été acquises sur le même principe que d'autres cryo-MEB imageries du mucus dans la littérature [Kirch et al 2012]. Le mucus étant très majoritairement aqueux à 98% environ, la cryogénisation doit se faire très rapidement à haute pression afin d'éviter la formation de cristaux de glace qui déformeraient, voir détruiraient, le réseau que l'on souhaite imager. L'eau de l'échantillon doit être solidifiée sous forme amorphe. Cette première étape a été réalisée par Etienne Gontier du BIC (Bordeaux Imaging Center) de l'Université de Bordeaux. Les échantillons de mucus sont cryogénisés en 5 seconde maximum à 2050 bar dans un appareil de cryogénisation haute pression (Leica, HPM100) dans des portes échantillons (Leica) dédiés à la cryo-fracturation. Les échantillons, dans leurs portes-échantillons, sont ensuite conservés congelés dans de l'azote liquide. Les mucus cryogénisés sont ensuite transférés à Toulouse au CMEAB (Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie) de l'université Paul Sabatier de Toulouse III où ils sont imagés au cryo-MEB par Bruno Payre. Les échantillons cryogénisés sont placés dans une chambre de préparation (Quorum PP3000T) en suivant le protocole de Payre et al 2018 (Payre et al. 2018). Ils sont ensuite fracturés à -140°C, puis sublimés à -95°C durant 30 min, et enfin recouverts d'une fine couche de platine par pulvérisation. Pour finir les échantillons sont transférés dans une chambre (Quanta 250 FEG) maintenue à -140°C et placée sur l'appareil de MEB (FEI Quanta 250 FEG) pour être imagés sous une tension d'accélération de 5kV.

Six échantillons de mucus ont été analysés : deux de patients témoins, deux de patients fumeurs et deux de patients atteints de BPCO. Chacun des échantillons a été préparé en trois exemplaires de 30 μ L chacun afin de comparer les résultats et leurs reproductibilités au sein d'un même échantillon.

I.3. Résultats sur la rhéologie du mucus

I.3.1. Article 1 : Comparaison des propriétés viscoélastiques du mucus à l'échelle macro- et microscopique

I.3.1.1. Présentation de l'article 1

Bien que déjà abordé à plusieurs reprises dans la littérature, la rhéologie du mucus, en particulier celle du mucus bronchique humain, n'est pas encore clairement définie. Cela est notamment dû à la grande variabilité des résultats en fonction des études et des échantillons utilisés. La difficulté d'obtenir des échantillons humains de mucus bronchique, les biais possibles en fonctions des types de prélèvements (expectorations induites ou spontanées, prélèvement dans les bronches, cultures, ...), l'hétérogénéité du mucus et la modification possible de sa composition en fonctions de l'environnement, impactent et modifient son comportement rhéologique. De plus, la complexité du mucus, de sa composition à sa structure, complexifie l'analyse et l'interprétation des résultats rhéologiques obtenus. Notre projet porte sur l'étude du mucus issu d'un modèle d'épithélium bronchique humain à partir de cultures en interface air-liquide (ALI). Ce modèle a l'avantage de permettre des prélèvements de mucus abondant, purement bronchique, et sans impact environnementaux donc aux caractéristiques beaucoup plus stables et constantes dans le temps.

Notre objectif était de caractériser les propriétés rhéologiques du mucus issu des cultures ALI d'épithélium. A l'échelle macroscopique ($\sim 200 \mu\text{m}$ d'épaisseur), en rhéologie de cisaillement, pour avoir son comportement global ; et à l'échelle microscopique (de l'ordre du μm), grâce à des pincettes optiques, pour sonder l'hétérogénéité du réseau. De plus, ces deux approches permettent d'étudier le comportement du mucus à l'échelle de la couche sur le tissu (de l'ordre de $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur), cisailé par le battement ciliaire et le flux d'air, et à l'échelle d'un cil, d'une bactérie ou d'une microparticule (de l'ordre de $0,1$ à $10 \mu\text{m}$). Une fois la rhéologie caractérisée, sa possible utilisation comme marqueur de la BPCO a été posée. Les résultats obtenus sur la rhéologie entre les deux échelles nous ont amenés à proposer une interprétation de la structure du mucus permettant d'expliquer ses propriétés mécaniques particulières.

Les apports de cet article sont :

- La caractérisation rhéologique du mucus bronchique humain issu de cultures ALI (Figures 1, 2 et 3) couplée à une caractérisation de sa composition en termes de pH, masse sèche, concentration en protéines et en ions sodium Na^+ , potassium K^+ , chlorure Cl^- et bicarbonate HCO_3^- (Table 2).
- La comparaison entre le comportement viscoélastique à l'échelle macroscopique dominé par l'élasticité et celui à l'échelle microscopique dominé par la viscosité (Figures 2B et 3). Une hypothèse sur l'impact de la concentration du mucus sur cette différence est posée, à l'aide de l'étude rhéologique de solutions de polysaccharide de diverse concentration mimant les propriétés rhéologiques du mucus (Figure 5). Une imagerie du réseau du mucus, réalisée en

cryo-SEM (Figure 7), a également été faite pour aider à comprendre la structure du mucus expliquant le comportement rhéologique observé. L'hypothèse d'un couplage de deux réseaux aux caractéristiques différentes (tailles des pores, viscoélasticité, ...) est avancée.

- La mise en évidence de l'hétérogénéité du mucus et la présence d'élasticité et d'adhésion localisées aux interfaces à l'échelle microscopique (Figure 6).
- L'évaluation de l'utilisation de la rhéologie du mucus comme marqueur et diagnostic de la BPCO à partir de mucus de cultures ALI (Figure 4 et Table 1). Aux vues de nos premiers résultats, un diagnostic ne semble pas possible à partir des résultats des modules viscoélastiques G' et G'' , sur les deux échelles.

Remarque. Dans cet article seul le mucus issu du modèle de culture avec le milieu BEGM de Lonza a été testé. Celui obtenu avec le milieu PneumaCult (Stemcell Technologies) étant plus viscoélastique et adhésif, et moins abondant, il a été très difficile d'en prélever. Lorsque cela a été possible (N=4), les quantités trop faibles (< 80 μ L) n'ont pas permis de faire des mesures de macro-rhéologie et de composition. Seuls le pH et la micro-rhéologie ont pu être mesurés dont les résultats sont présentés ci-après dans l'article 2. Idem avec le mucus « ex vivo ».

I.3.1.2. Article 1 : "Rheology of mucus from ALI (Air Liquid Interface) cultures of human bronchial epithelium"

Soumission prévue au journal *BioMacromolecules*

Rheology and adhesion forces of mucus from human bronchial epithelial cell cultures

*Myriam JORY¹, Dario DONNARUMMA¹, Christophe BLANC¹, Karim BELLOUMA¹, Aurélie FORT², Isabelle VACHIER², Laura CASANELLAS¹, Arnaud BOURDIN², Gladys MASSIERA^{*1}*

¹ Laboratoire Charles Coulomb, Université de Montpellier & CNRS UMR 5221, 34095 Montpellier, France

² Inserm U1046, Université de Montpellier, Respiratory Disease, CHU Montpellier, 34295 Montpellier, France

KEYWORDS. Mucus, rheology, adhesion, hydrogel, polysaccharides

Abstract. Mucus is a viscoelastic aqueous fluid that acts as a protective barrier in the airways and in other mammal's organs. Its rheological properties are crucial to its transport and thus to the mucociliary function. Human bronchial epithelium (HBE) cultures are considered as models of human lungs tissues. We combined macro- and micro-rheology techniques to quantify the viscoelastic properties of mucus collected from HBE, at different length scales: from the size of one bronchial cilia up to the scale at which mucus is transported, and for healthy, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and smokers HBE cultures. We showed that all the essential features of mucus rheology are preserved at the different scales, in particular shear thinning behavior and elastic response at low shear, but that mucus viscoelasticity depends on the probing length-scale. We discuss these results considering the high heterogeneity of mucin gels and the existence at a microscopic scale of mucus mediated adhesion forces that we have probed using optical tweezers.

Introduction

Mucus is a viscoelastic sticky fluid coating mucosal surfaces. It serves as a hydration, lubrication and/or protection barrier for many mammalian organs such as the respiratory, gastrointestinal, urogenital epithelia, and for the ocular system. This hydrogel is produced by epithelial secretory cells. Depending on its function and on the organ it is associated with, mucus composition, structure and physical properties vary significantly. In airways, water comprises ~ 98% of mucus, while salt and organic compounds represent ~2%. The anionic glycoproteins mucins are the major functional components of mucus hydrogels. Their concentration in bronchial epithelia is ~ 0.2-1.0 wt% (Kirkham 2002). Mucins forming the hydrogel network are called gel-forming mucins (GFMs). Two of them (MUC5AC and MUC5B) are the most expressed in the airways. In aqueous solution, these high molecular weight proteins form a viscoelastic network by both covalent links and reversible interactions. Disulfide bonds polymerize GFMs into long linear polymers thanks to their cysteine-rich domains. Entanglements, hydrophobic interactions and side chain electrostatic interactions further reinforce and stabilize the network. These weaker reversible interactions are highly dependent on the extent of glycosylation and on physico-chemical parameters such as the ionic force, the pH and the concentration in mucin (Demouveau et al., 2018; Celli et al., 2007; Yakubov et al., 2007; Wagner et al., 2017). High responsiveness to these variables enables the modulation of physical and flowing properties of mucus, according to the physiological environment. The poor hierarchy in between interactions also makes the network highly heterogeneous. Since mucus viscoelastic and flowing properties are crucial for an efficient mucociliary clearance and for drug accessibility, rheological studies have been carried out in order to relate the hydrogel structure to its rheological characteristics (Demouveau et al., 2018; Kirch et al., 2012; Philippe et al., 2017; Gross et al., 2017). Shear is the dominant deformation in transport phenomena, and gels are thus characterized in the first place by the elastic and loss shear moduli related respectively to the energy stored and the energy dissipated in the gel. Rheology moduli reported in the literature span more than 5 orders of magnitude depending on the mucus origin and the way it is collected and assessed (Thomases, 2015). Nevertheless, most mucus gels share similar

rheological characteristics: i) elasticity: the elastic modulus is greater than the loss modulus and varies with the frequency according to a power law with exponents smaller than 1 and often close to 0 (Vasquez et al., 2014; Philippe et al., 2017; Gross et al., 2017; Ewoldt et al., 2007; Weigand et al., 2017; Celli et al., 2007; Wang et al., 2013; King and Macklem, 1977; Schuster et al., 2013); ii) shear-thinning and yield-stress: the mucus flows more easily at higher shear rates and only above a critical applied stress (Vasquez et al., 2014; Ewoldt et al., 2007; Celli et al., 2007; King and Macklem, 1977; Lai et al., 2009); iii) a non-linear response appears at deformations smaller than for mucus simulants (Ewoldt et al., 2007; Gross et al., 2017); iv) the response depends on the probing length scale: macro and microrheology assays of the same samples report elastic moduli values differing in amplitude and in frequency dependence (Gross et al., 2017; Bokkasam et al., 2016; Weigand et al., 2017). In addition, pH and mucin concentration were shown to have a dramatic effect on these characteristics at least for reconstituted mucus (Wagner et al., 2017; Celli et al., 2007). Finally, adhesive properties are another important feature of mucus. Filancemeter is a device which has been used to characterize mucus spinnability (Puchelle et al., 1983; Critchfield et al., 2013), by probing mucus under an extensional deformation. More recently, experiments performed on bronchial epithelium cultures, have enabled researchers to quantify both cohesiveness and adhesion (Button et al., 2018a). Variations in mechanical properties might have dramatic consequences. In airway diseases, including Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), the mucus composition and its physical characteristics are worth to be understood, and represent one of the higher patient related observations and complaints.

Here, we quantified, at different length scales, the viscoelastic properties of mucus collected from bronchial epithelium cultures by performing active micro and macro-rheological experiments. We first used macroscopic settings and compared the variability of viscoelastic moduli measured for mucus samples collected from cultures of different kinds of patients (smokers, patients with COPD and healthy controls). We show that all the essential features of mucus rheology are conserved, in particular a shear thinning gel behavior, and a response dependent on the probing length scale. The macroscopic characterization is then compared with microrheology experiments, performed with optical tweezers. Both scales are relevant to the mucociliary function: from the micron-size bronchial cilia up to the scale at which mucus is transported (\sim cm). These results are discussed

considering the high heterogeneity of mucin networks and the existence of mucus mediated adhesion forces that are quantified using optical tweezers.

Materials and Methods

Bronchial epithelial cultures at the air-liquid interface. Bronchial biopsies from 6 healthy patients, 8 smokers and 5 COPD patients were collected during fiberoptic bronchoscopy on a subsegmental bronchus of the left lower lobe at Arnaud de Villeneuve hospital (Montpellier, France). All donors signed a consent form after being informed about the biomedical research on airway epithelium performed thanks to their donation. The protocol was approved by the institutional ethics commission of Sud Méditerranée III (CHRU Montpellier - AOI 9244 – NCT02354677). Primary human bronchial epithelial cells were obtained from bronchial biopsy specimens and cultured under Air Liquid Interface (ALI) conditions (Jeffery et al., 2003), adapted from Gras et al. (Gras et al., 2017) and Gamez et al. (Gamez et al., 2015). Briefly, bronchial epithelial biopsies were mechanically dissociated and suspended in bronchial epithelial growth medium (BEGM, Lonza). After an expansion phase in monolayers, cells were plated on uncoated nucleopore membranes (24-mm dia., 0.4 μm pore size, Transwell Clear, Costar) in a 1:1 mixture of BEGM and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) until confluence. Then, the ALI phase can take place after removing the medium above the cells. The culture medium is then provided only above the membranes. Cells were cultured for 28 days to obtain a polarized differentiated epithelial population with a mucociliary phenotype.

Mucus samples. Mucus, when efficiently produced by the ALI cell culture, was gently collected with a micropipette every other day and stored at 4°C, for a maximum of 6 months. Typically, for

one ALI culture and after two days, 50 to 100 μL of secreted mucus were gathered. The day of collection is recorded for all our samples (D0 is the day at which the culture is put under ALI conditions). The samples analyzed in this study were selected at D20 when possible and were always in the range D17 to D24.

Synthetic mucus samples. In order to obtain comparative models, several samples of polysaccharides solutions were prepared. We used the protocol described by Lafforgue *et al.* (O. Lafforgue et al., 2017) using a galactomannan gum (Viscogum FA), and a scleroglucan (Actigum CS 6) from Cargill. First, the Viscogum was diluted in a 0.9 wt % NaCl solution at room temperature up to 0.5 wt % of the final solution and let to rest for one hour. The Actigum was then progressively added up to a final concentration varying from 0.1 to 2 wt %. To favor cross-linking of the galactomannan chains, samples were stirred for 48 hours before addition of a 0.02M solution of Borax (di-sodium tetraborate) at a volume fraction of 2%. Samples were stirred for an additional hour before being used or stored at 4°C. The samples were used for the experiments no more than 4 weeks after preparation.

Macrorheology. Macrorheology experiments were performed using an Anton Paar MCR 502 and MCR302 rheometer with a cone/plate geometry. The cone is 25 mm in diameter and has an angle of 1°, resulting in a gap of 436 μm at the cone edge. This geometry advantageously requires a small sample volume (80 μL). Experiments were performed at 20°C, using a low viscosity silicone oil deposited all around the sample edge to prevent evaporation. We carefully checked that experiments performed at 37°C and 20°C provided similar results. We also checked, by performing experiments with a humidity-saturated hood, that the presence of silicone oil with a low viscosity of 20 mPa.s did not induce an additional friction that could alter the rheological response. We waited 5 min between each test to relax residual stresses within the mucus. For

dynamical rheological tests, each measurement was performed after three shearing cycles. In steady shear experiments, measurements were done after a steady-state was reached (less than 30 s for the mucus).

LAOS macrorheology. Macrorheology experiments have been performed in the non-linear regime by applying large amplitude oscillatory shear (LAOS) using a strain imposed rheometer (ARES) with a cone-plate geometry. The cone is 25 mm in diameter and has an angle of 1.15°. Experiments were performed at room temperature (22-25°C), using a low viscosity silicone oil around the cone edge to prevent evaporation. An oscillatory strain sweep was applied at 1 Hz on 5 cycles. The time variation of the applied strain $\gamma(t)$ and the resulting stress $\tau(t)$ were analyzed with the MIT- LAOS routine developed by Ewoldt et al. (Ewoldt et al., 2009) and coded in MatLab (version 2.2 Beta). The first cycle of the signal was not taken in account to prevent contributions from a transitional regime. The analysis of the oscillatory signal enabled to fit the stress signal using a multi-harmonic function and infer the amplitude of each harmonic. The elastic moduli G'_1 , and e_3 correspond to the amplitude of the fundamental and third harmonics, respectively. G'_M is the tangent to the Lissajous curve stress-strain, $\tau(\gamma)$, at zero strain, and G'_L is the stress to strain ratio at maximum strain.

Microrheology - Sample preparation. Micron-sized beads were dispersed in the mucus samples in order to be used as probes in active microrheology experiments. The concentration of beads in the samples (0.004%v/v) was chosen in order to obtain microscopy chambers with area density lower than 400 beads per mm^2 . Four different types of beads were used: silica beads (Bangs Laboratories Inc), diameter of 0,96 μm or 4,56 μm , melamine resin beads (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich), diameter of 5 μm , and carboxylated melamine resin beads, diameter of 3 μm . The mucus was then sandwiched in between a glass slide and a coverslip (both pegylated) separated

by a mylar spacer. The thickness of the spacer (100 or 175 μm) and the dimensions of the cell were chosen accordingly to the mucus volume available in order to minimize the residual air volume. After filling the chamber, the cell was rapidly (~ 2 minutes) sealed with UV curable adhesive (ThorLabs NOA81) to prevent water evaporation. During UV exposure, the mucus was protected with a reflector (aluminum foil).

Microrheology - Optical Tweezers setup. The optical tweezer setup is mounted on an inverted optical microscope LEICA DMI 3000 B placed on an air-damped anti-vibration table (Workstation Series, Melles Griot). The optical trap is generated by the focalization of a laser beam (1064 nm laser YLM 5W, from IPG Photonics) through a x100 (NA 1.4) oil immersion objective. The oscillating trap position is controlled thanks to a pair of acousto-optic deflectors (AA optoelectronic). Alternatively, for lower frequencies and higher laser intensity, the sample is moved thanks to a piezoelectric XY stage (Nano-Bio100 from MCL with a subnanometer accuracy). The trapped microsphere is imaged on a CCD camera Basler Scout-F. A multifunction Field Programmable Gate Array (FPGA) is used to control the different devices and acquire data through a LabVIEW homemade program. The bead position is obtained by image correlation analysis under LabVIEW at a sub-pixel resolution ($\sim 4\text{nm}$).

Microrheology – Methodology. Microrheology experiments was performed by trapping a single bead using the optical trap and by applying a small sinusoidal displacement to the bead relative to the sample it is immersed in. The fluid viscoelastic properties, at the driving frequency ω , can be inferred from the bead position relatively to the trap center (Tassieri et al., 2010; Shundo et al., 2013). In the following, we consider a displacement of the stage $x_s^* = A_s e^{j\omega t}$ (with A_s the amplitude of the stage displacement) and a fixed trap. In the linear regime, a bead of radius a

follows the sinusoidal displacement with a phase shift φ , and its trajectory is given by $x_b^* = A_b e^{j\omega t} e^{j\varphi}$ (with A_b the amplitude of the bead displacement). The strain is defined as $\gamma = (A_s - A_b)/2a$. Following the analysis by Shundo et al. (Shundo et al., 2013) and other authors, the complex shear modulus $G^* = G' + jG''$ is related to the ratio of the fluid forces acting on the bead to its displacement with respect to the fluid (taking into account a $6\pi a$ factor for a spherical bead). The fluid forces being opposed by the restoring harmonic force of the trap of stiffness k_{OT} , one gets:

$$G^* = \frac{k_{OT} x_b^*}{6\pi a (x_b^* - x_s^*)} = -\frac{k_{OT} A_b e^{j\varphi}}{6\pi a (A_b e^{j\varphi} - A_s)}$$

and leads to:

$$G' = \frac{k_{OT}}{6\pi a} \frac{-A_b^2 + A_s A_b \cos\varphi}{A_b^2 + A_s^2 - 2 A_b A_s \cos\varphi}$$

$$G'' = \frac{k_{OT}}{6\pi a} \frac{A_s A_b \sin\varphi}{A_b^2 + A_s^2 - 2 A_b A_s \cos\varphi}$$

where G' and G'' are, respectively, the elastic and loss modulus.

The stiffness k_{OT} of the trap can be obtained with two different methods (Neuman and Block, 2004). The first method consists in recording the bead positions which result from thermal fluctuations of the bead within the trap. We infer the trap stiffness k_{OT} by fitting the distribution of the bead positions by a Boltzmann distribution $\sim \exp\{-E/k_B T\}$, with $E = k_{OT} x_b^2 / 2$ and $k_B T$ the thermal energy. This method was used for all mucus collected from ALI cultures (measured laser power P at the entrance of the objective from 20 to 100 mW). For adhesion force measurements and for the most elastic samples of synthetic mucus (> 0.5 wt % in Actigum), a

higher laser intensity ($P > 1$ W) was required in order to keep the bead trapped. In this configuration, the Brownian motion cannot be detected. We then calibrated the trap stiffness in water as a function of the laser power using the drag force method (Neuman and Block, 2004), exploiting the fact that the optical index of the medium ($n \approx 1.335$) is very close to the index of water. We checked that both calibration curves overlap along a linear dependence $k_{OT}(P)$. In our experiments, we imposed $As = 1\mu m$ or $As = 0.5\mu m$ depending on the elasticity of the sample. We measured both Ab and φ for a range of frequency f between 0.09 and 50 Hz. All experiments were conducted at room temperature. Nevertheless, we measured the temperature of the sample near the trap which reached 30°C, because of local heating generated by the laser. In a previous work (Jory et al., 2019), we showed that a temperature increase doesn't significantly affect the mucus rheological behavior. The decrease of the viscoelastic moduli is lower than 50% at the microscale from 20 to 27°C and 40% at the macroscale from 20 to 37°C. The set-up and the protocols were first tested with a well-studied viscoelastic model system of giant micelles for which we obtained rheological curves very close to the macrorheology ones (Berret et al., 1997; Massiera et al., 2002).

Optical Tweezers - Adhesion forces. Two approaches were used to assess mucus local adhesion forces. In a first experiment, we selected an isolated bead (melamine resin, diameter 5 μm) stuck on the PEGylated coverslip. Beforehand, beads were left for approximately 20 minutes at rest after sedimentation to let them stick onto the glass coverslip. The selected bead could be however pulled up, approximately 10 μm away from the coverslip to prevent any wall effects during the bead displacement. The bead being trapped at a high laser power (~ 1 W), we applied a triangular wave signal of the stage displacement, resulting in a back-and-forth displacement $X(t)$ of the mucus relatively to the trap center, with an amplitude of 10 μm and a constant velocity $v = 0.88 \mu m/s$.

The restoring force resulting from adhesion was computed from the bead displacement X_{bead} and from the previously calibrated trap stiffness k : $F_{xy} = k X_{\text{bead}}$. In the second approach, performed at much lower laser power (10-30 mW), we drew a 4.5 μm in diameter silica bead near the vertical wall of a UV adhesive (ThorLabs NOA81) pillar. These pillars stuck onto the cover slip are produced using a PDMS mold prepared by microlithography. A drop of UV curable adhesive is sandwiched in between a coverslip and the mold, before being cured. The mold is then gently peeled off. The bead was initially kept in contact with the wall for 1 minute before being pulled away very slowly ($< 0.1 \mu\text{m/s}$), up to a fixed distance of 10 μm . The resulting adhesion forces $F_{xy} = k X_{\text{bead}}$, were then monitored by recording the bead position from the trap center at 30 frames/s for 2 minutes or until rupture of the adhesion.

pH measurements. The pH was assessed with pH paper from Macherey-Nagel pH-Fix, which provides pH values in the range 7.5-9.5, with a 0.2 accuracy. The pH value was measured immediately after the droplet had been placed on the paper. We did not wait for a complete absorption of the mucus on the pH paper because of the quick alkalization of the mucus in contact with ambient air. The pH was measured three times in order to evaluate the impact of storage at 4°C on pH variation and mucus preservation: when the mucus was collected from the culture, after a maximum of two weeks stored at 4°C, and prior to a macro-rheology test.

Dry mass. To determine the mucus dry mass with accuracy, we used a thermogravimetric analysis (TGA) instrument (Mettler Toledo TGA1 STARE System). 20 μL of mucus were required for each measurement and an isotherm water evaporation was performed at 60°C under a nitrogen flow of 60 mL/s. The final relative error was around 0.05% mainly coming from the error on the initial

mass because of fast mucus evaporation. The error was computed from the maximum and minimum values of three individual measurements performed on the same mucus sample.

Proteins and salts. The concentration measurements for Na^+ , Cl^- , K^+ , HC03^- ions and proteins reported in Table 1, have been performed by the CEA (Grenoble, France). 100 μL of mucus sample were used for all measurements using three analyzers provided by COBAS INTEGRA with their protocols: ‘Total Protein Urine/CSF Gen.3’ (Roche Diagnostic) for the proteins concentration (‘Total Protein Urine/CSF Gen. 3’, 2007); ‘ISE Indirect’ (COBAS INTEGRA) for the concentration in Na^+ , Cl^- and K^+ (‘ISE Indirect’, 2018); and ‘Bicarbonate liquid’ (COBAS INTEGRA) for the HC03^- concentration (‘COBAS Integra Bicarbonate liquid’, 2003).

Cryo-Scanning Electron Microscopy (Cryo-SEM). For the mucus network imaging, we analyzed 6 mucus samples collected from cell cultures from 2 healthy controls, 2 smokers, and 2 patients with COPD. The mucus has been inserted between two high-pressure freezing (HPF) specimen carriers dedicated to cryofracture (Leica) and was loaded immediately into a HPM100 HPF machine (Leica). Samples were fixed and frozen within 5 ms at 2050 bar and samples were then transferred to cryovials in liquid nitrogen. Then HPF specimen carrier with frozen mucus was inserted into the preparation chamber Quorum PP3000T. For insertion, specimen shuttle cryo stubs and HPF specimen carrier adapter were used following the protocol from Payre *et al.* (Payre *et al.*, 2018). After a fast transfer under vacuum in the preparation chamber, the samples were fractured at -140°C , sublimed at -95°C during 30 min and then coated by platinum sputtering. They were at last transferred in the cryo-SEM Quanta 250 FEG chamber and kept at -140°C during observation with a FEI Quanta 250 FEG scanning electron microscope at an accelerating voltage of 5kV.

Results and Discussion

1. Macrorheology

Shear rheology experiments were performed with a controlled-stress rheometer mounted with a cone-plate geometry, at room temperature. Both steady and dynamic experimental conditions were explored. Although it is not the most suitable on very soft gels, the cone-plate geometry with small dimensions was imposed because of the small quantities of mucus at our disposal. This geometry implies working close to the limit of sensitivity of the apparatus. It is therefore important to check that the reported results are free of artifacts. To ensure the relevance of our measurements, we explored the different sources of errors such as the device torque limits or inertial effects, and computed the limits of validity (Ewoldt et al., 2015), and found that our measurements fall into the confidence region (Fig. S1 supplemental information section).

Shear flow and yield stress. The shear flow response of mucus samples was measured by imposing a steady shear with increasing shear rates. Fig. 1 represents the shear viscosity η vs. shear rate $\dot{\gamma}$ measured on mucus collected from ALI cultures of cells from 6 healthy controls, 8 smokers and 5 patients with COPD. No significant difference was observed. The variability in amplitude obtained between groups is indeed comparable to the variability obtained within different samples of the same kind. We observed for all the curves that the steady shear viscosity strongly decreases on the entire range of explored shear rates. This strong shear thinning behavior can be described by a power-law $\eta \propto \dot{\gamma}^\beta$ with an averaged exponent $\beta \approx -0.85$. For the smallest, experimentally accessible, shear rate $\dot{\gamma} \sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, we find a viscosity $\eta \approx 100 \text{ Pa} \cdot \text{s}$, but no plateau is recovered. The absence of a constant viscosity in the limit of small shear rates together with the value obtained for the scaling exponent β , are two signatures of the fluid yielding behavior.

Yield stress A yield stress can indeed be evidenced when representing the flow curve as shear stress versus shear rate (supplemental, Fig. S2A): at very low shear rates ($\sim 10^{-3}\text{s}^{-1}$) the measured stress does not tend to zero but to a yield stress value, $\tau \approx 0.05$ Pa. In addition, creep tests also show that mucus flows only above a yield stress of the same order of magnitude as illustrated in Fig. S2B of the supplemental information.

Yield-stress fluids display a solid-like behavior at low stress and flow only above a critical applied stress, after the solid structure collapses. Emulsions, foams, colloidal suspensions or granular media are examples of yield-stress fluids and can have different relevant physiological functions. For instance, a biomechanical mechanism relying on the yielding properties of pedal mucus has been described for the adhesive locomotion of snails and slugs. A thin layer of mucus (with an effective yield stress of $\tau_c \approx 100$ Pa) enables these animals to advance through steep surfaces (Ewoldt et al., 2007). The difficulty to precisely and unambiguously determine the yield stress, depending on the detailed experimental protocol or the measurement geometry, has been well documented in the literature recently (Møller et al., 2006; Coussot, 2014; Oswald, 2005). Our purpose here is only to illustrate the existence of a yield stress for mucus collected from human bronchial epithelium cultures and to show that its value (even if we consider the upper estimate obtained from the flow curve $\tau_c \approx 0.2$ Pa) is very small compared to the typical value reported in the literature for other yield stress materials.

Dynamic shear response. Dynamic shear experiments were performed to measure mucus linear viscoelastic properties. An oscillatory stress was applied to the sample at a frequency ω . We first determined the range of amplitudes for which the fluid response is linear. In Fig. 2A, the elastic G' and loss G'' moduli measured for $\omega = 6$ rad. s^{-1} are reported for increasing strain. We find for

most curves that both moduli are constant for strain lower than 3%, which sets the limit of the linear response. Within this linear viscoelastic regime, the fluid response is mostly elastic, with a storage modulus (G') about twice as large as the loss modulus (G''). A significant decrease in G' is observed for strain larger than 10%, whereas G'' remains almost constant up to 50%. Above 50%, the elastic and dissipative contributions are comparable in magnitude.

Large Amplitude Oscillatory Shear. We also explored the non-linear response using a LAOS (Large Amplitude Oscillatory Shear) approach on a few samples (Fig.S3 and table S1 supplemental) with a strain imposed rheometer and over a 10-1000% strain range. A LAOS framework was proposed by Ewoldt et al. and illustrated on various viscoelastic samples among which a gastropod pedal mucus (Ewoldt et al., 2008). To evaluate non-linear effects in a graphical way, Lissajous-Bowditch curves of stress τ versus strain γ can be plotted: a distortion of the expected ellipse shape is the hallmark of non-linearities. A Chebyshev stress decomposition allows to infer G'_1 , the harmonic modulus measured as τ/γ at the fundamental frequency and e_3 at the third harmonic. G'_M is the tangent modulus at $\gamma = 0$, and G'_L is the secant modulus evaluated at the largest imposed strain γ_{max} . We computed the elastic dimension-less index of non-linearity, $S = \frac{(G'_M - G'_L)}{G'_M}$ and the ratio of the third harmonic modulus over the first one, e_3/G'_1 . Both are reported in table S1 in supplemental information. For both samples, we obtained a similar decrease in the viscoelastic moduli G'_1 , G'_M , G'_L with strain, and increasing non-linear coefficients e_3/G'_1 and S . We found that S , which should be equal to 1 in the linear regime, was always greater than 0 ranging from 0.3 up to 0.64. S positive sign reveals a strain stiffening behavior at high shear strains. These results are comparable to the ones obtained for gastropod pedal mucus (Ewoldt et al., 2008) or mucus collected from horse lungs (Gross et al., 2017; Vasquez et al., 2014). Further experiments should be addressed to determine the use of such an approach as a diagnostic marker.

In Fig. 2B, we show the linear viscoelastic moduli, G' and G'' , obtained by performing a frequency sweep at a strain of 1%, within the linear regime. In the range of experimentally accessible frequencies ($0.6 < \omega < 60 \text{ rad. s}^{-1}$), the elastic contribution (G') dominates over the dissipative one (G''). The elastic modulus increases with the applied frequency according to a power-law, with an exponent $\alpha \approx 0.2$. In both Fig. 2A and 2B, curves obtained for control, smokers and COPD mucus are represented in different colors for comparison. No significant difference was observed between set of curves corresponding to different pathologies as further illustrated in Fig.4A and B, which respectively compares the values of G' and G'' at 6.3 rad. s^{-1} and the power-law exponent α . We also found that the linear shear response was not dependent on the culture maturity by measuring G' and G'' of mucus from the same patient collected on ALI cultures from Day 10 to Day 30 (Fig. S4).

2. Microrheology

Microrheology experiments have been performed using optical tweezers to apply a local strain typically between 5 and 20%. Imposing an oscillatory displacement to a probe trapped within the mucus, we measured the resulting force acting on it.

We mostly used melamine resin beads of $3 \mu\text{m}$ in diameter. Additional experiments using beads of different surface chemistries and sizes (carboxylated melamine resin beads and silica beads, and bead diameters ranging from 1 to $5 \mu\text{m}$) showed no significant differences in the viscoelastic response (Fig S5). The transition from a linear to a non-linear regime was evaluated by performing a shear strain sweep at $f= 1\text{Hz}$ (Fig. S6). The onset of non-linearities appeared between 10 and 20% in strain. Experiments were performed at strain values lower than 20%. The G'' values reported in Fig. 3 were obtained by averaging 4 to 18 measurements performed on different beads

and at different spatial locations within the sample. The results shown correspond to mucus samples derived from ALI cultures of healthy patients (controls, N=5), smokers (N=2) and patients with COPD (N=5). The elastic moduli were at least two orders of magnitude smaller than those obtained from macrorheology experiments (Fig. 2). Besides, contrarily to the elastically dominated response obtained in macrorheology experiments, the rheological response measured at a local microscopic scale was dominated by dissipation: i) the loss modulus was larger than the elastic modulus by a factor ≈ 5 (Inset Fig.3), over the entire range of explored frequencies ($0.6 < \omega < 300 \text{ rad. s}^{-1}$); ii) G'' increases almost linearly with ω (scaling law exponent $0.75 < \alpha < 1$) as expected for a Newtonian fluid. Similar results were obtained using the passive microrheology method (data not shown) in line with the literature (Hill et al., 2014; Wagner et al., 2017; Dawson et al., 2003). In Fig. 4A, the storage G' and loss G'' moduli measured at 1Hz extracted from the macro and micro-rheology results were quantitatively compared for controls, smokers and COPD samples. In all cases, the values span more than 1 order of magnitude and micro and macro moduli differ by at least 2 decades. No significant difference was recorded between the three different groups. In Fig. 4B, the reported power law exponents highly differed between micro and macro-rheology experiments, reflecting the dissipative ($\alpha \approx 0.75-1$) versus the elastic ($\alpha \approx 0.05-0.25$) behavior of these mucus samples. Nevertheless, we found slightly significant differences in power law exponent between controls and COPD samples on micro-rheology exponents and between smokers and COPD samples for macro-rheology. All p-values are reported in Table 1. p was computed for N experiments per group with a bilateral T Test and reported when $N \geq 5$. Two ensembles were considered significantly different when p was lower than 0.05. These differences remained small and would benefit from larger Ns but suggest that mucus secreted by ALI epithelial

cultures from COPD patients was slightly more fluid-like at a micro-scale and slightly more elastic at a macroscopic scale.

Nevertheless, considering the number of accessible samples and the results previously described, the rheological response does not seem to be able to distinguish any groups in a way it could be used as a pathology marker. We studied other biochemical characteristics to check whether the mucus composition differed between the three groups: pH, dry mass, salt and protein content were quantified for mucus samples from controls, smokers and COPD and are reported (Table S2 of supplemental). As for rheology, we did not observe any significant difference in those biochemical parameters. Moreover, there is no correlation between the dry mass or the protein concentration and any rheology index. None of the p-values is greater than 0.05. It would be interesting nevertheless to measure specific protein content such as MUC5B and MUC5AC.

3. Mucus simulants

In order to better understand the discrepancy between micro and macrorheology, which is now admitted (Weigand et al., 2017; Gross et al., 2017; Bokkasam et al., 2016), we compared our results on mucus rheology to rheology measurements performed on mucus simulants made of polysaccharides and which have a macrorheology response mimicking the *ex vivo* mucus rheology (Lafforgue *et al.*, 2017; Lafforgue *et al.*, 2018). We measured the micro and macro rheology of mucus simulants of various compositions (Fig.5). Low concentrations reproduced the same differences recorded with mucus collected from HBE culture: the complex fluid behaved as a viscous fluid at a micro scale and as an elastic fluid at a macro scale. When the concentration increases, the samples got more elastic in microrheology (Fig. 5B) and slightly less elastic in macrorheology (Fig. 5A). A plot of the power law exponents for the $G'(f)$ response, for increasing

concentrations (Fig. 5C), indicated that macro and micro rheology tend towards one another when the sample and the structures it forms become denser. This evolution with the concentration suggests that the observed discrepancies in the mechanical responses are related to the presence of heterogeneity and only a few large scale structures in the most dilute samples. Cryo-electron microscopy was performed to illustrate the multi-scale structure often reported in the literature (Kirch et al., 2012; Gross et al., 2017; Philippe et al., 2017; Johansson et al., 2000) responsible for the mucus mechanical response in mucus. Illustrative pictures at different magnifications are shown in Fig.5 D-F. Mucus structure was found to be highly heterogeneous, filamentous at the largest length scale (Fig.5 E), and more foam-like structure, at smaller scales (Fig.5 D, F). These electron microscopy data are to be taken with caution. They reflect only parts of the sample and probably the denser regions and it is also plausible that the fixing/freezing process might concentrate the mucus in some parts of the sample. We thus hypothesize that a foam like structure such as previously suggested (Gross et al., 2017) is plausible and could participate to the discrepancy between micro and macro-rheology. This hypothesis is supported by indirect observation of the presence of a few but strongly elastic structures connecting probe beads together or with the solid walls of the chamber.

4. Adhesion properties at a microscale

In all experiments performed using microrheology, we used probes that were at least at a distance of 20 μm from the glass slides. Nevertheless, when trapping a bead closer to the glass slides, we obtained much larger forces, which would result, in terms of rheological behavior, into an elastically-dominated response of the mucus (data shown in SI, Fig. S7), instead of a dissipative-dominated behavior. The typical values obtained for the elastic modulus are at least one order of magnitude larger than those measured in the bulk.

The presence of strongly elastic structures in the mucus can be evidenced with simple approaches. In a first set of experiments we probed the mechanical behavior of beads that were in close contact to the coverslip of the chamber. a bead was initially placed in contact with a sticky surface and then pulled away at a low but steady velocity. The pull force required to impose the displacement was measured with optical tweezers, by converting the distance between the bead and the trap center into a force. In the first experiment, the contact was done by simple sedimentation of the bead on the bottom glass slide of the chamber and the bead was trapped after a minimum of 10 minutes. It was then possible to detach the bead from the surface but the bead was then lifted more than 50 μm away from the slide before we applied a periodic displacement of the chamber relative to the trap was applied at a constant velocity. We measured the corresponding displacement of the bead from the trap center, which could be converted to a force. The experiment is illustrated in Fig. 6A, which shows the chamber displacement and the measured force acting on the probe as a function of time. The bead experiences an effective force only when the magnitude of the imposed displacement of the sample relatively to the trap is maximal. During the remaining parts of the cycle the force fluctuates around zero, due to the thermal noise. We interpret these results as follows: when the bead is at rest in contact with the surface, we presume a microscopic structure may develop, for instance filaments, that we observe with electron microscopy (Fig.5D-F) linking the bead with the nearby surface. When the bead was pulled with the tweezer, the filament would be continuously extended, until full extension, corresponding to the maximal displacement of the chamber. At this point, the force measured with the tweezers would be clearly above the thermal noise. A sketch illustrating this possible interpretation is provided in Fig.6A. When the displacement decreases, the force is relaxed. We performed five experiments and obtained different results after several cycles. In some cases, the maximal forces increased with the number

of cycles, whereas in other experiments the maximal force was constant. It would be interesting to investigate the origin of these adhesion forces and determine in which conditions reinforcement would be relevant.

In the second experiment (Fig.6B), a bead was manipulated with the tweezers and put in contact with a vertical interface for several seconds, then was pulled away at a distance varying between 5 and 20 μm . We fixed the platform position and measured whether the force varied in time. This experiment provides an insight on the time scales and mechanisms associated with the relaxation of this adhesion force. In particular, we observed sudden force drops which might correspond either to partial rupture or to a complete rupture of the adhesive structures formed when the bead was in contact with the vertical interface. The partial rupture events would be in agreement with the existence of the filamentous structure observed at cryoSEM and that could be responsible for the adhesion and cohesiveness of the mucus. The adhesion and cohesiveness were recently accurately quantified at a larger scale by Button *et al.* (Button *et al.*, 2018) showing the role of dissipation and of the viscoelastic properties. Further experiments are currently being performed in order to more fully understand the adhesion properties and get deeper into the understanding of the adhesion properties of the mucus samples.

Conclusion

Combining micro and macro-rheology, we characterized the rheological response of mucus collected from bronchial epithelial ALI cultures, showing that it displays an elastic, shear thinning and yield stress behavior were predominant at a macroscopic scale, whereas it behaved as a viscous fluid at a microscale for solid particles. Strongly heterogeneous elastic structures are however present and responsible for heterogeneous adhesion forces acting on the particles especially in the

proximity of solid surfaces. New adhesion experiments performed at the scale of a cilium further support that filamentous structures are present in a foam like fluid explaining the discrepancies observed between micro and macrorheology behaviors. Based on these new experiments, novel approaches could be designed to further investigate the origin and regulation of adhesion properties of the airway mucus. This might be a more specific marker than bulk rheology.

Acknowledgements

Payre Bruno of CMEAB (centre de microscopie électronique appliquée à la biologie de l'université Paul Sabatier de Toulouse III) for scanning electron microscopy observation and Gontier Etienne of BIC (Bordeaux Imaging Center) for high-pressure freezing, and Véronique Chamel (CEA Grenoble, France) for proteins quantification.

Funding

This work has been supported by: Labex Numev, Fonds de dotation «Recherche en Santé Respiratoire» FSFR AAP2015-2-053, Vaincre la Mucoviscidose AP2016 RF20160501673, ANR Mucocil 13-BSV5-0015.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Gladys.Massiera@umontpellier.fr

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

Any additional relevant notes should be placed here.

ABBREVIATIONS

CCR2, CC chemokine receptor 2; CCL2, CC chemokine ligand 2; CCR5, CC chemokine receptor 5; TLC, thin layer chromatography.

REFERENCES

- Anon (2003) *COBAS Integra Bicarbonate liquid*. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf3/K031879.pdf.
- Anon (2018) *ISE Indirect* [online]. Available from: <https://www.gundersenhealth.org/app/files/public/6522/Lab-Policies-ISE-Indirect-Na-K-Cl--Integra-400-Plus-Lab-8641.pdf>.
- Anon (2007) *Total Protein Urine/CSF Gen. 3*. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/K071239.pdf.
- Bansil, R. & Turner, B. S. (2018) The biology of mucus : Composition , synthesis and organization ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1243–15.
- Berret, J. F. et al. (1997) Inhomogeneous shear flows of wormlike micelles: a master dynamic phase diagram. *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*. 55 (2), 1668–1676.
- Bokkasam, H. et al. (2016) Different macro- and micro-rheological properties of native porcine respiratory and intestinal mucus. *International Journal of Pharmaceutics*. 510 (1), 164–167.
- Boucher, R. C. (2019) Muco-Obstructive Lung Diseases. *New England Journal of Medicine*. 380 (20), 1941–1953.
- Button, B. et al. (2018a) Roles of mucus adhesion and cohesion in cough clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 201811787.
- Button, B. et al. (2018b) Roles of mucus adhesion and cohesion in cough clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115 (49), 12501–12506.
- Celli, J. P. et al. (2007) Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules*. 8 (5), 1580–1586.
- Coussot, P. (2014) Yield stress fluid flows: A review of experimental data. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 21131–49.

- Critchfield, A. S. et al. (2013) Cervical Mucus Properties Stratify Risk for Preterm Birth. *PLoS ONE*. 8 (8), 2–8.
- Dawson, M. et al. (2003) Enhanced Viscoelasticity of Human Cystic Fibrotic Sputum Correlates with Increasing Microheterogeneity in Particle Transport. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (50), 50393–50401.
- Demouveau, B. et al. (2018) Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Advances in Colloid and Interface Science*. 25269–82.
- Ewoldt, R. H. et al. (2015) Experimental challenges of shear rheology: how to avoid bad data. *Complex Fluids in Biological Systems*. 7 (1), 3866–3871.
- Ewoldt, R. H. et al. (2008) New measures for characterizing nonlinear viscoelasticity in large amplitude oscillatory shear. *Journal of Rheology*. 52 (2008), 1427.
- Ewoldt, R. H. et al. (2009) Nonlinear viscoelastic biomaterials: Meaningful characterization and engineering inspiration. *Integrative and Comparative Biology*. 49 (1), 40–50.
- Ewoldt, R. H. et al. (2007) Rheological fingerprinting of gastropod pedal mucus and synthetic complex fluids for biomimicking adhesive locomotion. *Soft Matter*. 3634.
- Gamez, A. S. et al. (2015) Supplementing Defect in Club Cell Secretory Protein Attenuates Airway Inflammation in COPD. *CHEST*. 147 (6), 1467–1476.
- Georgiades, P. et al. (2014) Particle tracking microrheology of purified gastrointestinal mucins. *Biopolymers*. 101 (4), 366–377.
- Gras, D. et al. (2017) Epithelial ciliated beating cells essential for ex vivo ALI culture growth. *BMC Pulmonary Medicine*. 17 (1), 1–7.
- Gross, A. et al. (2017) A foam model highlights the differences of the macro- and microrheology of respiratory horse mucus. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 71 (March), 216–222.
- Hill, D. B. et al. (2014) A biophysical basis for mucus solids concentration as a candidate biomarker for airways disease. *PLoS ONE*. 9 (2), 1–11.
- Jeffery, P. et al. (2003) Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: Application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 168 (6 II), .
- Johansson, M. et al. (2000) Histochemistry and Ultrastructure of the Intraluminal Mucus in the Sperm Reservoir of the Pig Oviduct. *Journal of Reproduction and Development*. 46 (3), 183–192.
- Jory, M. et al. (2019) Mucus microrheology measured on human bronchial epithelium culture. *Frontiers in Physics*. 7 (FEB), 1–12.
- King, M. & Macklem, P. T. (1977) Rheological properties of microliter quantities of normal mucus. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology*. 42 (6), 797–802.
- Kirch, J. et al. (2012) Optical tweezers reveal relationship between microstructure and nanoparticle penetration of pulmonary mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (45), 18355–18360.

- Lafforgue, O. et al. (2017) Rheological characterization of macromolecular colloidal gels as simulants of bronchial mucus. *AIP Conference Proceedings*. 1914 (December), .
- Lafforgue, O. et al. (2018) Rheological properties of synthetic mucus for airway clearance. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 106 (2), 386–396.
- Lafforgue, O. et al. (2017) Thermo-physical properties of synthetic mucus for the study of airway clearance. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. [Online] 105 (11), 3025–3033.
- Lai, S. K. et al. (2009) Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61 (2), 86–100.
- Leal, J. et al. (2017) Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 532 (1), 555–572.
- Massiera, G. et al. (2002) Role of the size distribution in the elasticity of entangled living polymer solutions. *Europhysics Letters*. 57 (1), 127–133.
- McShane, D. et al. (2003) Airway surface pH in subjects with cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 21 (1), 37–42.
- Møller, P. C. F. et al. (2006) Yield stress and thixotropy: On the difficulty of measuring yield stresses in practice. *Soft Matter*. 2 (4), 274–283.
- Neuman, K. C. & Block, S. M. (2004) Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*. 75 (9), 2787–2809.
- Oswald, P. (2005) *Rhéophysique: ou comment coule la matière*. Belin. Paris: .
- Payre, B. et al. (2018) A new HPF specimen carrier adapter for the use of high-pressure freezing with cryoscanning electron microscope: two applications: stearic acid organization in a hydroxypropyl methylcellulose matrix and mice myocardium. *Journal of Microscopy*. 271 (3), 255–265.
- Philippe, A. M. et al. (2017) Mucus as an Arrested Phase Separation Gel. *Macromolecules*. 50 (20), 8221–8230.
- Potter, J. L. et al. (1963) Human pulmonary secretions in health and disease. *Annals New York Academy of Sciences*. 106692–697.
- Puchelle, E. et al. (1983) Spinability of bronchial mucus. Relationship with viscoelasticity and mucous transport properties. *Biorheology*. 20 (2), 239–249.
- Schuster, B. S. et al. (2013) Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Biomaterials*. 34 (13), 3439–3446.
- Shundo, A. et al. (2013) Optical tweezers with fluorescence detection for temperature-dependent microrheological measurements. *Review of Scientific Instruments*. 84 (1), .
- Tassieri, M. et al. (2010) Measuring storage and loss moduli using optical tweezers: Broadband microrheology. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 81 (2), 1–5.
- Thomases, B. (2015) *Complex Fluids in Biological Systems*. Saverio E. Spagnolie (ed.).
- Vasquez, E. S. et al. (2014) Rheological characterization of mammalian lung mucus. *RSC Advances*. 4 (66), 34780–34783.

Wagner, C. E. et al. (2017) A Rheological Study of the Association and Dynamics of MUC5AC Gels. *Biomacromolecules*. 183654–3664.

Wang, Y. Y. et al. (2013) The microstructure and bulk rheology of human cervicovaginal mucus are remarkably resistant to changes in pH. *Biomacromolecules*. 14 (12), 4429–4435.

Weigand, W. J. et al. (2017) Active microrheology determines scale-dependent material properties of *Chaetopterus* mucus. *PLoS ONE*. [Online] 12 (5), 1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176732>.

Yakubov, G. E. et al. (2007) Molecular structure and rheological properties of short-side-chain heavily glycosylated porcine stomach mucin. *Biomacromolecules*. 8 (11), 3467–3477.

(Word Style “TF_References_Section”). References are placed at the end of the manuscript.

Authors are responsible for the accuracy and completeness of all references. Examples of the recommended format for the various reference types can be found at <http://pubs.acs.org/page/4authors/index.html>. Detailed information on reference style can be found in *The ACS Style Guide*, available from Oxford Press.

FIGURES

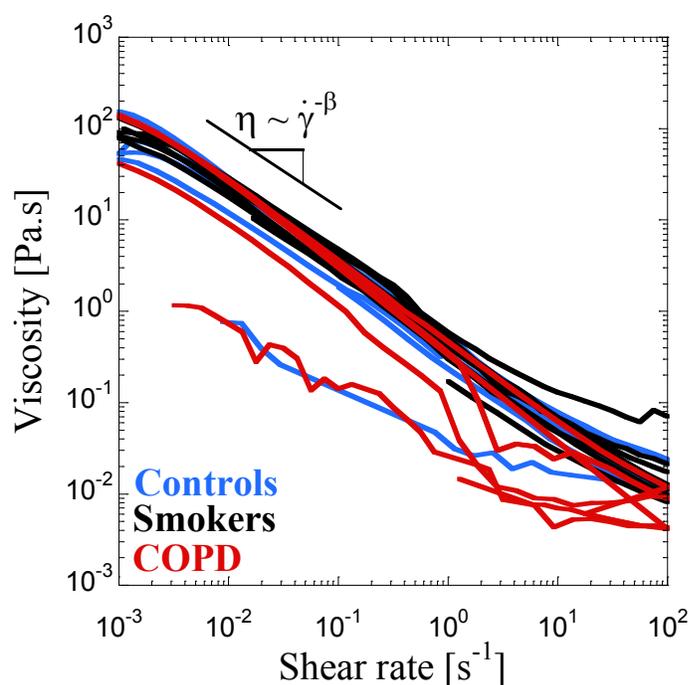


Figure 1. Mucus flow curves obtained from macrorheology measurements. Viscosity as a function of shear rate for mucus collected from human bronchial mucus corresponding to healthy controls (N = 6, blue), smokers (N = 8, black) and patients with COPD (N = 5, red).

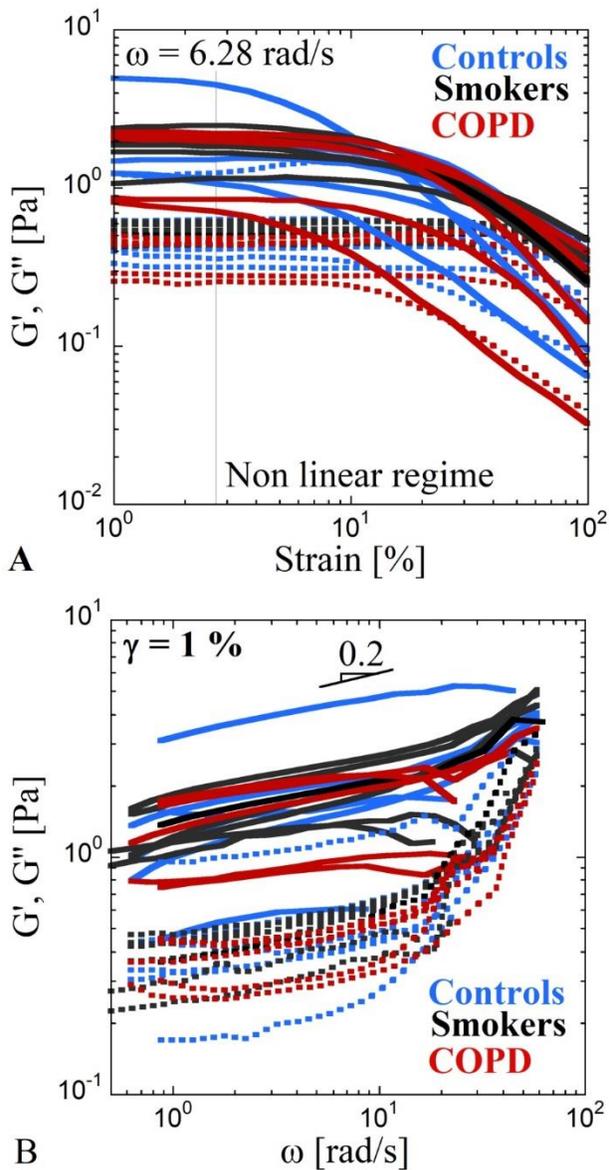


Figure 2. Mucus viscoelasticity measured in macrorheology tests. A) Storage G' and loss G'' moduli as a function of the strain (solid and dotted lines respectively) at $\omega = 6$ rad/s. We fixed the onset of the non-linear regime at 3% (grey vertical line). B) Storage G' (solid line) and loss G'' (dotted line) moduli as a function of the frequency measured in the linear viscoelastic regime ($\gamma = 1\%$). α_M stands for the power law exponent of G' versus ω . Mucus samples are collected from human bronchial epithelial cultures corresponding to healthy controls ($N = 6$, blue), smokers ($N = 7$, black) and patients with COPD ($N = 5$, red).

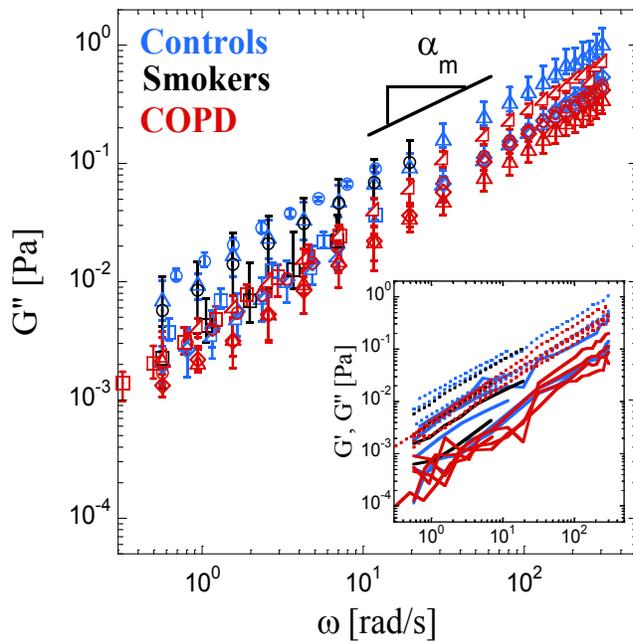


Figure 3. Mucus viscoelasticity measured in microrheology, using optical tweezers. Loss G'' modulus (empty symbols) as a function of the frequency, with a displacement amplitude of $1 \mu\text{m}$ measured on mucus collected from HBE mucus corresponding to 5 healthy patients (controls in blue), 2 smokers (black) and 5 patients with COPD (red). The curves represent the mean value on N measurements performed in several spatial locations within the preparation chamber. For controls in blue: circles, $N=6$; triangles, $N=4$; squares, $N=7$; diamonds, $N=5$; up-triangles, $N=4$. For smokers in black: squares, $N=18$; circles, $N=9$. For COPD patients in red: triangles, $N=5$; up-triangles, $N=4$; circles, $N=4$, squares, $N=5$, diamonds, $N=4$. The errors bars represent the mucus heterogeneity with the min-to-max values obtained from these N measurements. Both moduli, G' (solid lines) and G'' (dotted lines) are represented in the inset as a function of the frequency.

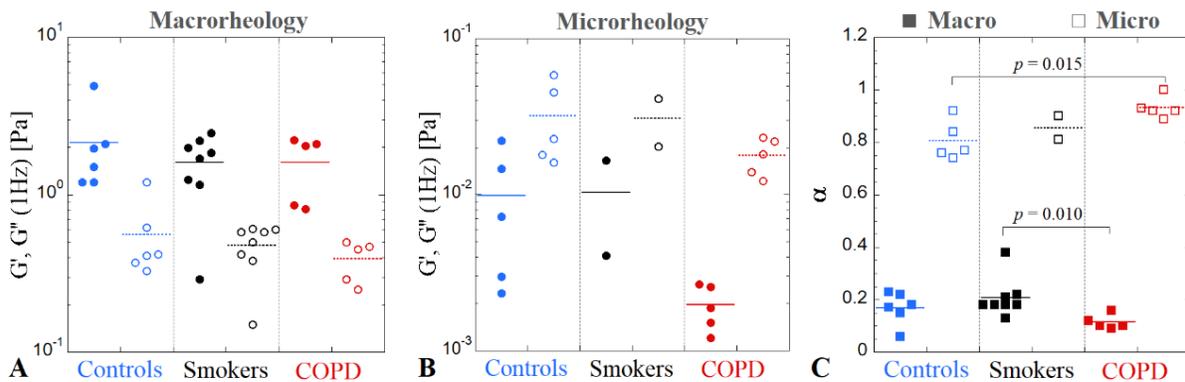


Figure 4: Comparison between macro and microrheology experimental results obtained for collected mucus samples. Mucus are collected from HBE cultures corresponding to: controls (blue), smokers (black) and COPD (red). A). The storage G' (full circles) and loss G'' (empty symbols) moduli measured in the linear regime at 1 Hz , in macrorheology (data from Fig2A) and B) in microrheology (data from Fig3). The lines represent the mean value. The p-values p (Table 1) are obtained with a bilateral T Test and reported on the graphs when significant ($p \leq 0.05$). C)

The exponent α of the power law of $G'(\omega)$ at the macroscale (full squares) (data from Fig2B) and of $G''(\omega)$ at the microscale (empty squares) (data from Fig3).

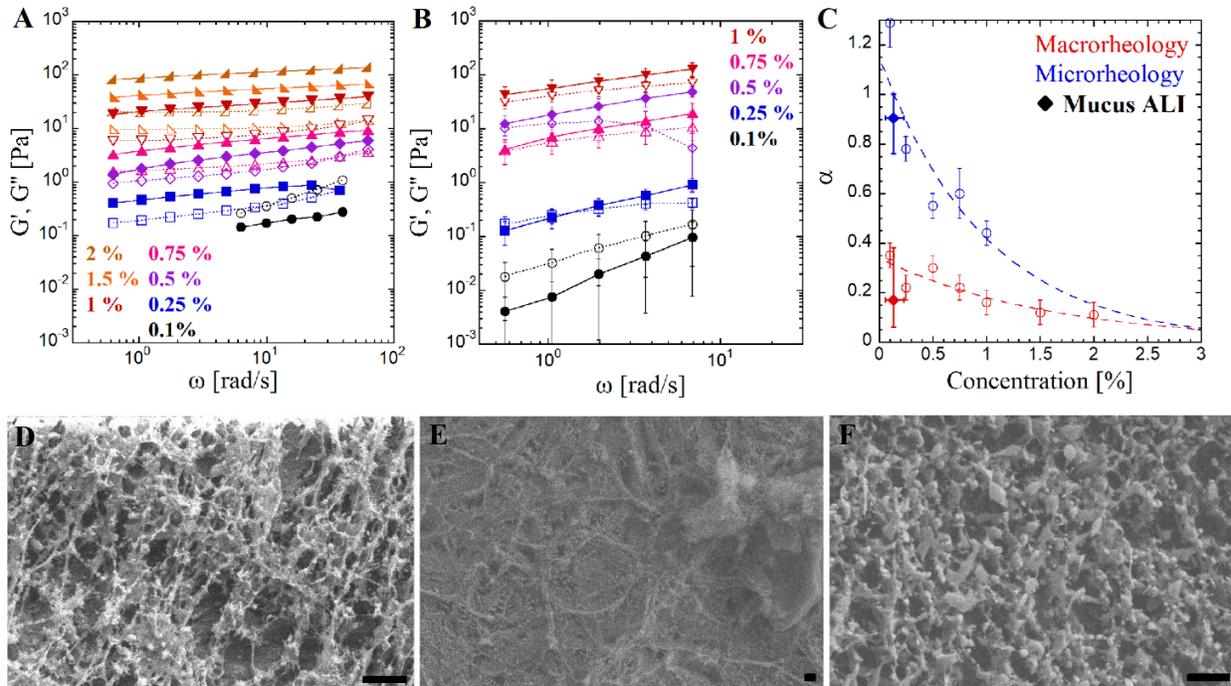


Figure 5. A-C) Comparison of macro- and micro-rheology results on a synthetic mucus at several concentrations. Storage G' (full symbols and solid lines) and loss G'' (empty symbols and dotted lines) moduli as a function of the frequency measured for 7 different concentrations of Actigum: 2 (dark orange right triangles), 1.5 (orange left triangles), 1 (red triangles down), 0.75 (pink triangles up), 0.5 (violet diamonds), 0.25 (blue squares) and 0.1 % w/w (black circles), performed in macrorheology (A) and in microrheology (B). C) Power law exponent α of $G'(\omega)$ as a function of the Actigum concentration of polysaccharides solution (empty circles) measured from macrorheology (red) and microrheology (blue) Error bars represent the power law fit error and the dashed lines are guide for eyes. The filled diamond symbols are the corresponding averaged α values extracted from Fig.4 and plotted as a function of the total concentration in proteins (Table S2). D-F) CryoSEM images of mucus collected on HBE ALI cultures. Illustration of the heterogeneous structures obtained at different length scales. D) and E) are from a control mucus sample and F) is from a COPD mucus. Scale bar: 1 μm .

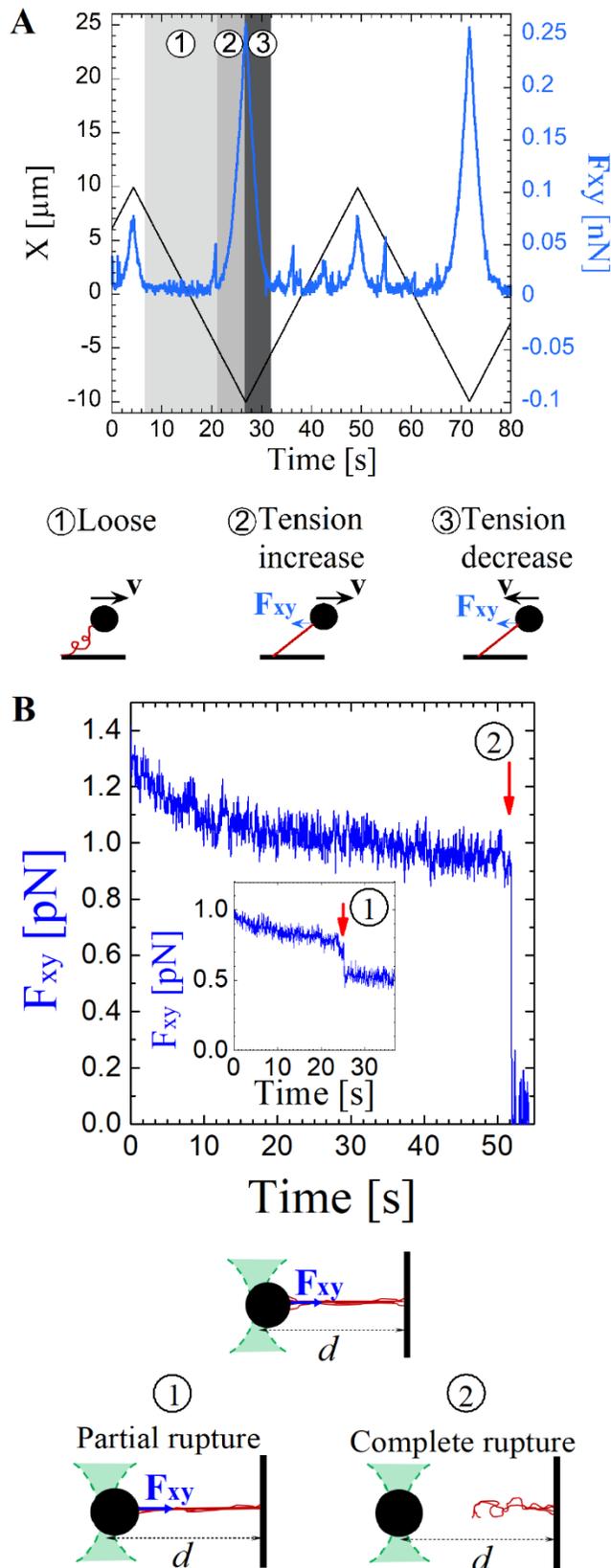


Figure 6. Mucus adhesion forces. Forces are measured with optical tweezers, by trapping 5 μm melamine beads. A) Force response under oscillatory pulling at a constant speed $v = 0.88 \mu\text{m/s}$ on a 10 μm amplitude, represented by the triangular displacement $X(t)$ of the mucus relatively to the trap center (black line). The force exerted on the trapped bead (blue line) is computed from the bead displacement X_{bead} and from the previously calibrated trap stiffness k : $F_{xy} = k X_{\text{bead}}$. The drawing illustrates the hypothesis that mucus filaments may be responsible for the tension forces measured, when pulling on a bead after it has put in contact with the glass slide. At small displacement (1) filaments are loose and no force is measured; at higher displacement the filaments exert a restoring force F_{xy} (2) which is released as soon as the displacement is decreased (3). B) Force versus time in response to an imposed displacement. After 1 minute of contact with a wall, a 4.5 μm diameter silica bead is held at a fixed distance d from the wall. Partial (1) and complete (2) release of the tension exerted on the bead, which may be potentially caused by the rupture of elastic mucus filaments.

TABLES.

p-values	Macrorheology					Microrheology			
	G'(1 Hz)	G''(1Hz)	G'/G''	Stress at G' = G''	α	G'(1 Hz)	G''(1Hz)	G'/G''	α
Controls / smokers	0.417	0.597	0.164	0.404	0.302				
Controls / COPD	0.435	0.289	0.788	0.678	0.091	0.104	0.168	0.027	0.015
Smokers / COPD	0.998	0.282	0.139	0.265	0.010				

Table 1. p-value p for: Controls / Smokers, Controls / COPD, and Smokers / COPD. Several rheological parameters had been chosen. In macrorheology: the values of the storage G' and loss G'' moduli in linear regime at 1 Hz (reported in Fig4A), along with the ratio G'/G'' at 1 Hz and also the stress value within the non-linear regime for which $G' = G''$ (see data Fig2A); the exponent α of the power law fit of $G'(\omega)$ (reported in Fig4C) (see data Fig2B). In microrheology: the values of the storage G' and loss G'' moduli at 1 Hz (reported in Fig4B), along with the ratio G'/G'' at 1 Hz, and the exponent α of the power law fit of $G''(\omega)$ (reported in Fig4C) (see data Fig3). p is computed for N experiments per group with a bilateral T Test and reported when $N \geq 5$. The values in bold are the ones significant ($p \leq 0.05$).

Supporting Information

Macrorheology

Rheometer limitations. Mucus collected from ALI cultures of HBE (BEGM media) are weakly viscoelastic ($G' \sim 1$ Pa) and the linear regime is limited to small strain and stress ($< 5\%$ or < 0.1 Pa). In these conditions, our measurements are close to the torque detection limit of the rheometer. In Fig. S1I, we show the measurement limits due to the rheometer torque, the inertia (geometry and sample) and the fluid secondary flow, expected for our mucus samples with the Anton Paar MCR502 rheometer equipped with a cone/plan geometry ($d=25\text{mm}$, $\theta=1^\circ$), in steady (Fig. S1A) and dynamic (Fig. S1B) measurements. The limits computation relies on the formula presented by Ewoldt *et al.* (Ewoldt *et al.*, 2015). We can see that the reported measurements fall within the limits and are thus reliable.

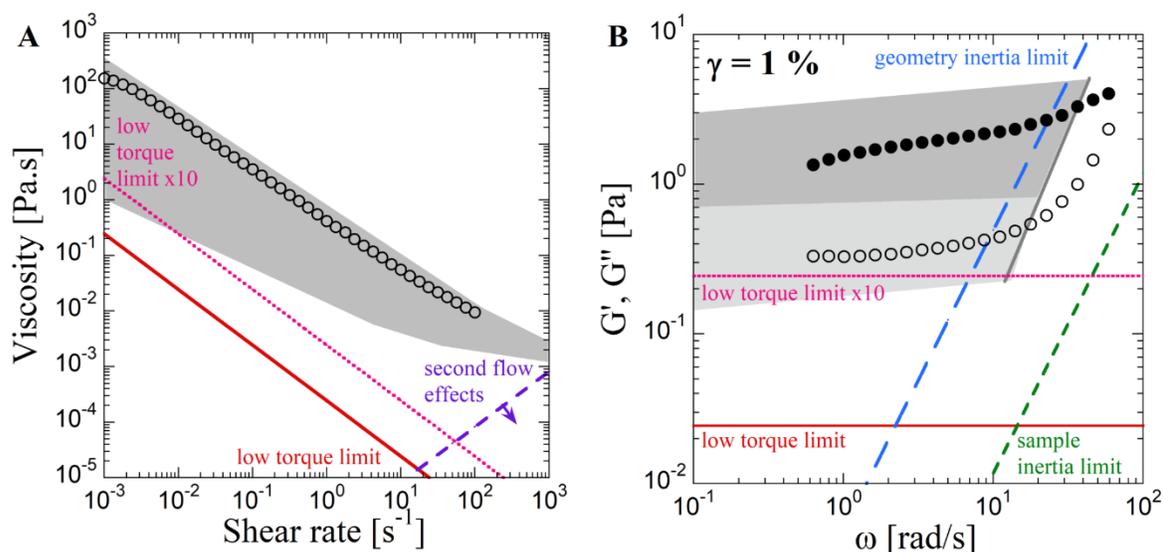


Figure S1: Experimental limitations of the Anton Paar MCR502 rheometer, with a cone/plate geometry, on mucus samples. The example of a COPD mucus sample is represented (black circles) and the range of values of all our mucus samples is showed by the grey areas. A) Limitations in steady measurement with the example of a flow curve and B) limitations in dynamic measurement with the elastic G' (filled symbols) and viscous G'' (empty symbols) moduli in function of the

angular frequency ω . The different lines in colour represents the limits, computed from Ewoldt et al. 2015 (Ewoldt et al., 2015), with the cone dimension ($R=25$ mm and $\theta=1^\circ$), the minimal torque that the rheometer can measure (1 nN.m), the inertia of the geometry (1.16 $\mu\text{N.m.s}^2$), the mucus density (1000 kg/m^3), the phase shift δ between G' and G'' ($\tan^{-1}(0.3 \pm 0.1)$) and the critical Reynolds number $\text{Re}_{\text{crit}}=1$ (for a torque measurement error of 1% and a mucus viscosity $\eta_0 \sim 0.4$ Pa.s ($\eta = \eta_0 \dot{\gamma}^\beta$)).

Yield stress. We show in Fig. S2B, as a representative example, the results obtained for a control patient. While in the limit of small applied stress values the strain reaches a plateau (solid-like behavior), for applied stresses above a critical stress value (τ_c) the fluid deformation continuously increases in time (liquid-like behavior). We could set this critical value, for which the transition from solid to liquid-like behavior is observed, as the fluid yield stress, $\tau_c = 0.05$ Pa. However, the yield stress values vary considerably and cannot be considered as reproducible. In addition, the values obtained for the yield stress are very close to the resolution of the instrument. In fact, the difficulty to precisely and unambiguously determine the yield stress, depending for example on the detailed experimental protocol or the measurement geometry, has been well documented in the literature over the last decades (Møller et al., 2006; Coussot, 2014; Oswald, 2005). Being conscious of such experimental limitations, our purpose here is only to illustrate the existence of a yield stress for the mucus samples and show that this value (even if we consider the upper estimate obtained from the flow curve $\tau_c = 0.2$ Pa) is very small compared to typical value reported in the literature for other yield stress materials. At this typical deformation amplitude of $\dot{\gamma} < 0.1$, the corresponding shear stress is close 0.2 Pa. Note that this value is comparable to the yield stress reported previously. At applied stresses larger than the yielding behavior ($\tau > 0.2$ Pa), the G' modulus rapidly decreases as the solid network structure is broken down.

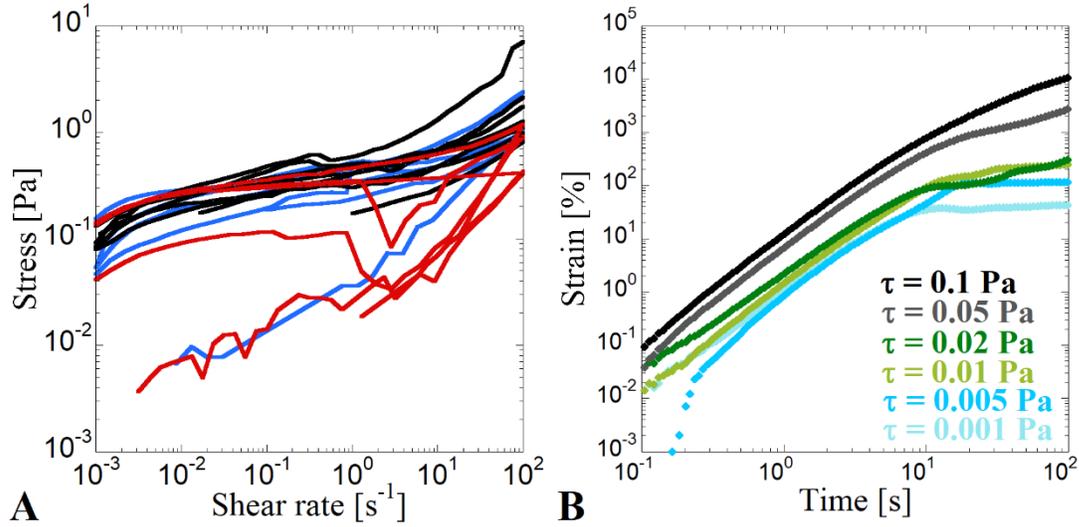


Figure S2: Yield stress of the mucus at macroscale with a cone/plate rheometer in steady shear measurement. A: Stress as a function of the shear rate, for a mucus collected from HBE cultures corresponding to different patient types: N = 6 controls (blue curves), N = 8 smokers (black curves) and N = 5 COPD (red curves). B: Creep test: strain as a function of time for a given imposed stress τ (colors) for collected mucus corresponding to a healthy patient (control).

Non-linear regime – LAOS. In Fig.SI3 we show the Lissajous curves ($\tau(t)$ in function of $\gamma(t)$) at 1 Hz for 2 mucus, collected from HBE cultures corresponding respectively to a control (Fig.SI3A) and to a COPD (Fig.SI3.B). The deformation of the ellipses reveals the non-linear behaviour of the mucus samples even at small shear. The elastic first-harmonic modulus G'_1 , the elastic Chebychev coefficient e_3 , the elastic modulus at zero strain G'_M , the elastic modulus at larger strain G'_L , e_3/G'_1 and $S = (G'_L - G'_M)/G'_L$ are shown in the Tab.S1. The ratio e_3/G'_1 is positive as the S ratio, for the 2 samples and the several strain imposed. It is the signature of a strain-stiffening behaviour (Ewoldt et al., 2008). It is consistent with the stronger adhesion force observed at large amplitude and speed of extension and the high mucus capacity of spinability (Puchelle et al., 1983; Button et al., 2018). Moreover, we see a maximum of the two ratio, therefore

the strain-stiffening behaviour, around 500 % of strain, then a decrease, as observed by Vasquez et al. (Vasquez et al., 2014).

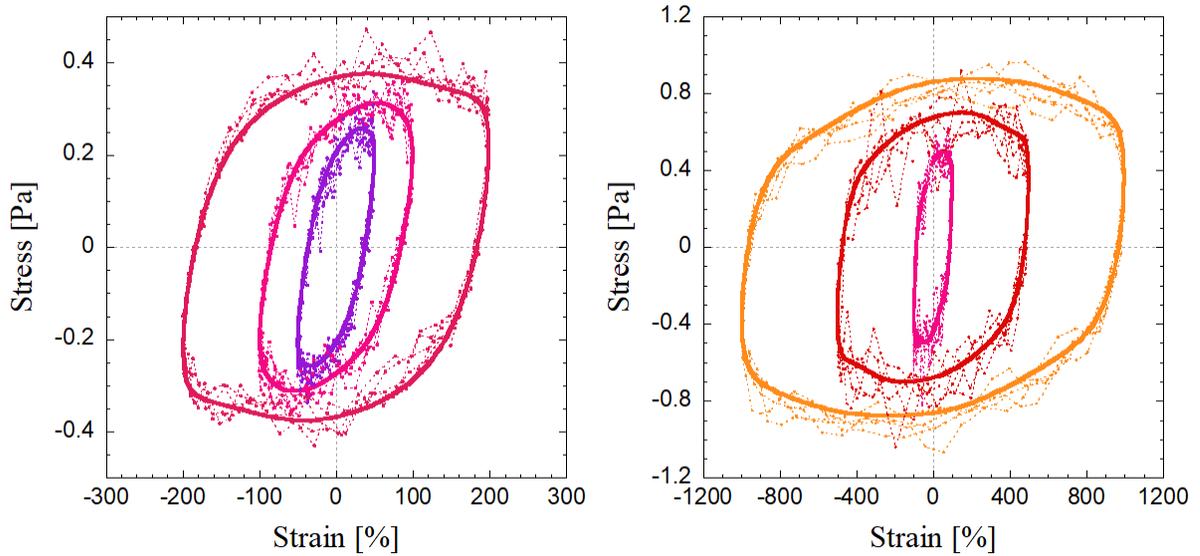


Figure S3: Lissajous representation of LAOS macro-rheology. Measurements are done at 1 Hz with the ARES rheometer and a cone/plan geometry ($d=25$ mm, $\theta=1,15^\circ$) at imposed strain (50%: violet, 100%: pink, 200%: dark pink, 500%: red and 1000%: orange). A) A mucus from a control patient and B) a mucus from a patient with the COPD disease. Light dashed lines represent the oscillatory signal of the stress versus strain on 4 cycles, and solid bold lines represent the mean filtered cycle.

	Strain [%]	G'_1 [Pa]	e_3 [Pa]	e_3/G'_1	G'_M [Pa]	G'_L [Pa]	S
Control (N=1)	50	0.37	0.03	0.09	0.28	0.41	0.32
	100	0.18	0.02	0.13	0.12	0.20	0.4
	200	0.08	0.02	0.30	0.04	0.11	0.64
COPD (N=1)	10	2.12	0.07	0.03	1.27	1.92	0.34
	100	0.29	0.05	0.17	0.25	0.38	0.34
	500	0.05	0.01	0.28	0.03	0.07	0.57
	1000	0.03	0.01	0.22	0.02	0.04	0.5

Table S1: Non-linear macro-rheology parameters of mucus, obtained with a LAOS approach, from data presented on a Lissajous representation in FigSI3. G'_1 corresponds to the value of τ/γ at the signal fundamental frequency and G'_3 at the third harmonic. G'_M is the tangent modulus at $\gamma = 0$, and G'_L is the secant modulus evaluated at the largest imposed strain γ_{\max} . The highlighted lines of the table are for the imposed strain $\gamma=100\%$, for which the viscoelastic coefficient were measured for both mucus samples.

Variability of mucus secretion in time. In Fig. SI4 we show the evolution of G' and G'' measured at 1 Hz, as a function of the day at which the samples were collected. Shaded regions included in the figure indicate the amplitude of the variations observed for both G' and G'' . This range of variation is comparable to the variability of the viscoelastic moduli measured for different patients displaying the same pathology. We do not observe any systematic trend of the viscoelastic moduli of the mucus in terms of the maturity of the culture. We thus consider that mucus rheological measurements corresponding to culture day can be compared.

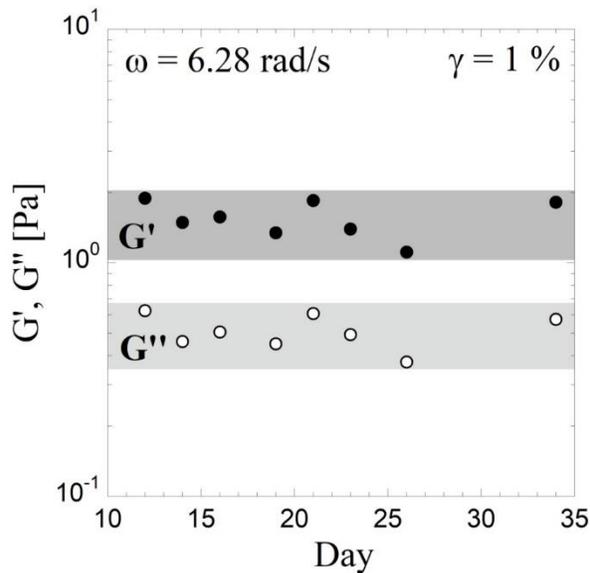


Figure S4: Variation of the mucus viscoelasticity during the ALI culture evolution. Storage G' (filled symbols) and loss G'' (empty symbols) moduli by rheometer cone/plate at 1 Hz and $\gamma = 1\%$ as a function of the culture age for human bronchial mucus extracted from ALI cultures corresponding to a smoker patient with 8 sampling days. The dark grey area shows the G' variation and the light grey area the G'' variation.

Microrheology

Impact of the probe size and composition. We have measured the mucus viscoelastic properties with 4 sizes of beads: 1, 3, 4.5 and 5 μm of diameter; and 3 types of surface composition: silica (1 and 4.5 μm), melamine resin (5 μm) and melamine resin with carboxylate termination (3 μm). In the Fig.S15 we represent, to the 4 beads kind, the values of the power law parameters (the magnitude G_0 (Fig.S5A) and the slope α (Fig.S5B)) of the curves $G'(\omega)$ and $G''(\omega)$.

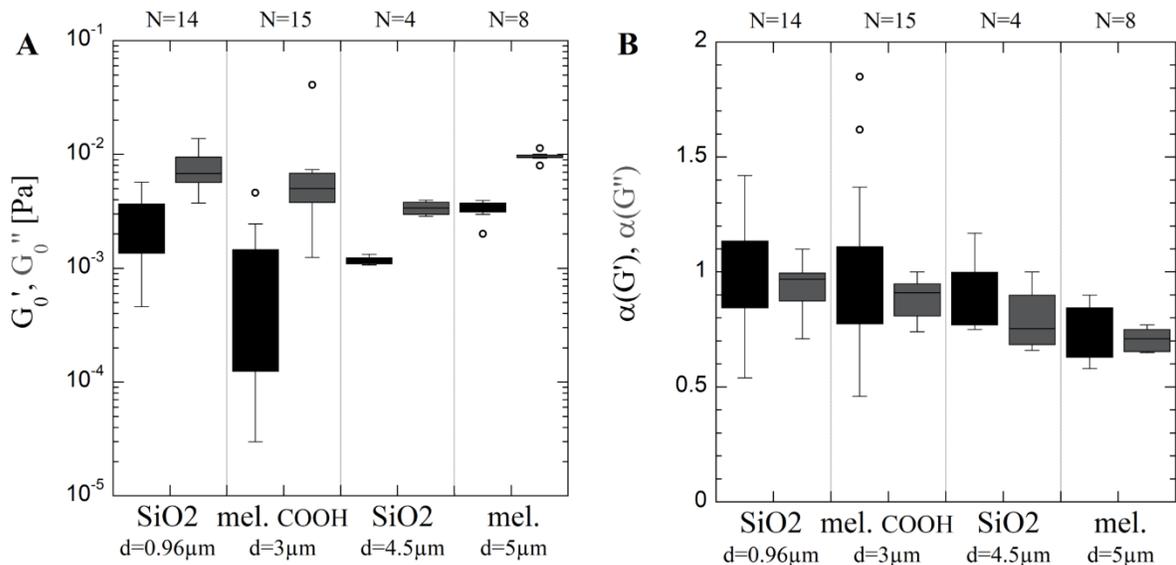


Figure S5: Impact of the probe size and composition on the mucus microrheology. The boxes represent A) the amplitude G_0 and B) the exponent α of the power law fit of the curves of the elastic G' (black) and viscous G'' (grey) moduli measured in function of the frequency f , thanks to optical tweezers. Several beads are tested: silica (SiO_2), melamine resin (mel.) and carboxyated melamine resin (mel. COOH). The diameter d of the beads is indicated on the graphs, as the number N of measurements realized with each kind of bead at different localisations. The measurements are done on a control human bronchial mucus sampled from ALI cultures

Strain range of the linear regime at the microscale. As for macrorheology, we define the linear regime of the mucus rheology measured at the microscale with optical tweezers. We

measure the G' and G'' moduli as a function of the amplitude of the sample displacement imposed, A_s , converted in strain γ : $\gamma = (A_s - A_b)/2a$, with A_b the amplitude of the bead displacement and a the bead radius (Fig.S6). Three measurements are performed at 3 different localisations inside the sample. The range of strain values corresponding to the reported measurements of Fig.3 is described by the grey area in Fig. S6, showing these measurements are within the linear regime.

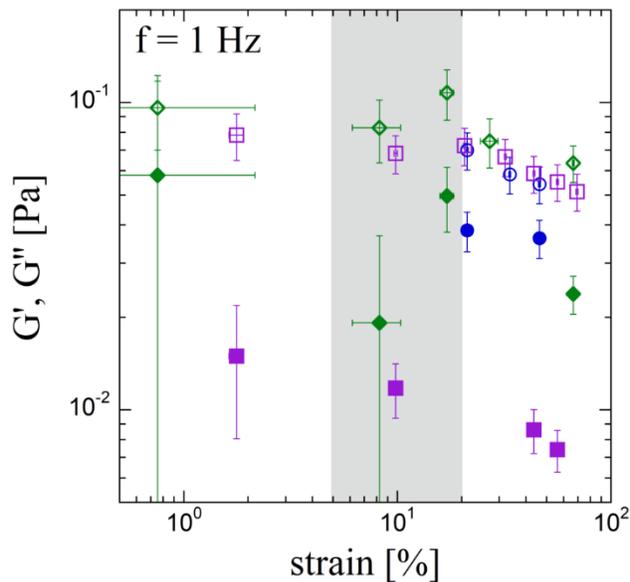


Figure S6: Determination of the transition from a linear to a non-linear regime from a microrheology experiment, with a shear strain sweep performed at $f = 1$ Hz. Storage G' (filled symbols) and loss G'' (empty symbols) moduli as a function of strain γ . The experiment was performed with mucus collected from the cultured epithelium of a healthy patient and the three different colours and symbols refer to three measurements at different localisation inside the sample. The grey area shows the strain range at 1 Hz on all our measurements show in Fig.3.

Elasticity close to interfaces. In microrheology, in bulk, we have observed a viscous behavior of the mucus, with a slope of the power law of $G''(\omega)$ around 0.80 and low values of viscoelastic moduli (10^{-3} - 10^{-2} Pa). But close to interfaces, such as the cover slip, impurities or microbeads aggregates, we measure an elastic behavior (Fig.SI7). The exponent of the $G'(\omega)$ power law and the values of the viscoelastic moduli are still lower than at the macroscale. Moreover, we observe

a large heterogeneity between measurements (N=5) close to interfaces, inside a same sample. The exponent of the power law varies from 0.3 to 0.6 and the values of G' at 1 Hz are in between $5 \cdot 10^{-2}$ and $2 \cdot 10^{-1}$ Pa. On some occasions, we observed (N=2) a ratio G''/G' very close to 1 and an intersection between the two curve $G'(\omega)$ and $G''(\omega)$.

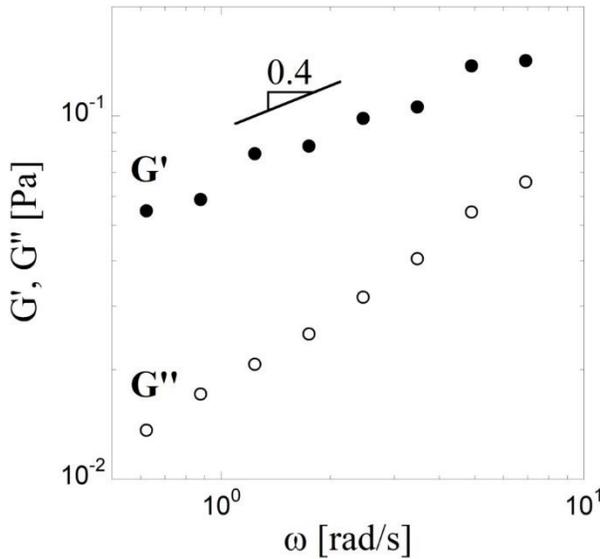


Figure S7: Illustration of the elasticity behaviour found near the interfaces. Mucus viscoelasticity at microscale at the close surface with Optical Tweezers. Frequency sweep with a sinusoidal displacement to amplitude of $\pm 1 \mu\text{m}$. Loss moduli G'' and in inset storage G' and loss G'' moduli as a function of the frequency (full and empty black circles respectively) for human bronchial mucus extracted from ALI cultures corresponding to a control patient. One measure, with a silica bead with a diameter of $4,92 \mu\text{m}$, to illustrate the elasticity near the interfaces result of strong adhesion of the mucus.

Mucus composition

The link between the mucus composition, in particular its protein concentration, and its rheological properties had been demonstrated (Hill et al., 2014; Georgiades et al., 2014). Moreover, the dry mass concentration of sputum seems to be a marker of respiratory diseases (Hill et al., 2014; Boucher, 2019). To see if the composition can be a marker on the mucus collected on ALI cultures of HBE we analysed the pH, the dry mass, the protein concentration and the salts concentration (Na^+ , Cl^- , K^+ , HCO_3^-). The mean value per groups (controls, smokers, COPD) is represented on the TableSI2. The concentration in K^+ is not in the table because it is lower than the detection limit in the majority of the sample analysed. The value of the pH is higher than those expected, in

between 6 and 7,5 for the bronchial mucus (McShane et al., 2003; Leal et al., 2017). The dry mass is close to 2% as the value admitted to normal respiratory mucus (Hill et al., 2014; Boucher, 2019) and the salt concentration is in accordance with the literature (Potter et al., 1963). But the protein concentration is largely lower than the value expected, around 1% w/w (Potter et al., 1963; Bansil and Turner, 2018). This low value of the protein fraction can be the result of a bias due to the collecting process, compounded by the strong adhesion of the mucus and its glycoproteins to the tissue (Button *et al.*, 2018) that promote the liquid phase of the mucus in the collection process. The comparison of the values between the 3 groups, for the 6 parameters, doesn't give significant differences (p-value computed with a t-student test > 0.05). The composition, as the rheological properties, is not a marker of smokers or COPD mucus from ALI cultures, to the extent of the limited number of sample analysed. Moreover, results don't show here, give no correlation between the mucus viscoelasticity (G' , G'' , power law parameters) and the dry mass or protein concentration. The dry mass is a too global parameter and a part can be the dead cells and impurities inside the sample. The proteins concentration is advanced in the literature (Hill et al., 2014), as in our results with the artificial mucus, such as very correlated to the rheological properties. But the low values and variations of the protein concentration between our samples (0.06-0.28% w/w) can explain that no correlation has been observed.

	pH	Dry mass [%]	Proteins [g/L]	Na ⁺ [g/L]	Cl ⁻ [g/L]	HCO ₃ ⁻ [g/L]
Controls	8.0 ± 0.8	1.96 ± 0.34	1.37 ± 0.39	3.63 ± 0.06	3.56 ± 0.29	0.99 ± 0.60
Smokers	7.8 ± 0.6	1.85 ± 0.41	1.49 ± 0.34	3.64 ± 0.23	3.92 ± 0.42	0.41 ± 0.28
COPD	8.1 ± 0.4	1.82 ± 0.55	1.39 ± 0.69	3.62 ± 0.02	3.66 ± 0.18	0.91 ± 0.51

Table S2: Composition of the mucus collected on ALI cultures and comparison between our three groups of patients (Controls, Smokers and COPD). The values are the mean ± standard deviation of all subjects in each group. For the control group the number of sample N is respectively N=10 for the pH, N=10 for the dry mass, N=4 for the proteins concentration, N=3 for the sodium Na⁺, N=3 for the chloride Cl⁻ and N=3 for the bicarbonate HCO₃⁻. These numbers N are for the smoker group, in the same order of the parameters, N=8, N=9, N=6, N=5, N=5 and N=4. For the COPD group it is N=5, N=5, N=4, N=4, N=4 and N=3. Neither p-value is significant ($p \leq 0.05$) for the 6 parameters between groups.

I.3.2. Article 2 : Evolution de la micro-viscoélasticité du mucus sur la culture en fonction de la distance au tissu et comparaison avec du mucus prélevé *in vivo*

I.3.2.1. Présentation de l'article 2

Les résultats obtenus dans le premier article nous ont montré la relativement faible concentration et viscoélasticité de notre mucus issu de culture ALI d'épithélium bronchique humain comparées à d'autres études sur le mucus bronchique (Kirch et al. 2012; E. S. Vasquez et al. 2014; Gross et al. 2017; Bokkasam et al. 2016). La question s'est posée de la représentativité du mucus de cultures du point de vue de ses propriétés rhéologiques. De plus, nous avons constaté que le prélèvement du mucus sur les cultures n'est pas complet et qu'une couche de mucus d'aspect plus opaque et adhésive reste systématiquement collée au tissu.

L'hypothèse d'une variation des propriétés rhéologiques du mucus en fonction de la distance au tissu s'est donc posée. Pour répondre à cette question nous avons mis au point une méthode de mesure de micro-rhéologie du mucus, directement sur l'épithélium sans biais de prélèvement, à l'aide de pincette optique. Grâce à cette méthode la viscoélasticité locale du mucus peut être sondée pour différentes distances aux cellules et à diverses positions sur le plan horizontal. Des échantillons de mucus humain bronchique prélevé lors de fibroscopie sur des patients nous ont également permis de comparer nos résultats rhéologiques issus des cultures à du mucus *in vivo*. Enfin, le milieu de nos cultures ayant changé au cours de notre projet, nous avons comparé les résultats de viscoélasticité du mucus à l'échelle microscopique entre les anciennes cultures avec le milieu BEGM (Lonza) et le nouveau milieu PneumaCult (Stemcell Technologies) utilisé.

Les apports de cet article sont :

- L'élaboration d'une méthode permettant d'accéder à la micro-rhéologie du mucus *in situ* sur l'épithélium (Figure 1) avec les pincettes optiques.
- Le constat d'une viscoélasticité différente entre le mucus prélevé sur la culture et celui mesuré *in situ* (Figure 2). Le mucus prélevé n'est pas représentatif de l'ensemble du mucus produit par l'épithélium. L'action de prélèvement instaure un biais en sélectionnant la part de la couche de mucus la moins visqueuse et la moins adhésive au détriment de celle plus viscoélastique et adhésive qui reste accrochée au tissu.
- La mise en évidence de l'évolution de la viscoélasticité de la couche de mucus avec la proximité au tissu (Figure 3). Nous avons montré que le mucus est plus viscoélastique à proximité des cellules (G' et G'' de l'ordre de 0,1 à 1 Pa), avec un comportement élastique dominant, c'est à dire un module élastique G' supérieur au module visqueux G'' et un exposant α de la loi de puissance de G' en fonction de la fréquence entre 0 et 0,3. A l'inverse, en s'éloignant du tissu la viscoélasticité décroît et le mucus devient visqueux avec $G'' > G'$. Cette observation est reproductible entre différents puits de cultures (N=2) et différents

patients (N=3). Les mesures sont également assez homogènes sur un même niveau de la couche quel que soit la position xy.

- La comparaison entre les propriétés micro-rhéologiques du mucus issu de culture et de prélèvement de mucus bronchique « ex vivo » ne permet pas de valider ou invalider le modèle ALI du point de vue des propriétés mécaniques du mucus (Figure 5). Le mucus récolté in vivo est très hétérogène au sein d'un même échantillon et entre les différents patients (Figure 4). La concentration locale en cellules mortes et débris cellulaires a un grand impact sur la viscoélasticité mesurée. Proche d'amas cellulaires l'élasticité domine avec le module élastique G' de l'ordre de 0,1 à 10 Pa et loin des amas la viscosité domine avec G'' de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-2} Pa.
- L'étude d'un modèle d'épithélium aux caractéristiques différentes (cultures ALI avec le milieu Pneumacult), avec un mucus plus concentré et plus viscoélastique (Figure 6) et une densité beaucoup plus importante de cellules ciliées qui battent, n'a pas permis de reproduire cette dépendance de la viscoélasticité du mucus en fonction de la distance à l'épithélium (Figure 7). La couche de mucus est plus hétérogène sur le plan xy (Figure 7D) qu'en fonction de la distance verticale au tissu.

I.3.2.2. Article 2 : “Mucus microrheology measured on human bronchial epithelium culture”

Article publié le 19 février 2019 dans *Frontiers in Physics* section *Biophysics* volume 7, article 19.
DOI : [10.3389/fphy.2019.00019](https://doi.org/10.3389/fphy.2019.00019)

Citation :

Jory M, Bellouma K, Blanc C, Casanellas L, Petit A, Reynaud P, Vernisse C, Vachier I, Bourdin A and Massiera G (2019). Mucus Microrheology Measured on Human Bronchial Epithelium Culture. *Front. Phys.* 7:19. doi: 10.3389/fphy.2019.00019



Mucus Microrheology Measured on Human Bronchial Epithelium Culture

Myriam Jory¹, Karim Bellouma¹, Christophe Blanc¹, Laura Casanellas¹, Aurélie Petit², Paul Reynaud², Charlotte Vernisse², Isabelle Vachier², Arnaud Bourdin² and Gladys Massiera^{1*}

¹ L2C, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France, ² PhyMedExp, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Department of Pneumology and Addictology, Montpellier University Hospital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France

We describe an original method to measure mucus microrheology on human bronchial epithelium culture using optical tweezers. We probed rheology on the whole thickness of mucus above the epithelium and showed that mucus gradually varies in rheological response, from an elastic behavior close to the epithelium to a viscous one far away. Microrheology was also performed on mucus collected on the culture, on *ex vivo* mucus collected by bronchoscopy, and on another epithelium model. Differences are discussed and are related to mucus heterogeneity, adhesiveness, and collection method.

Keywords: human bronchial epithelium (HBE), microrheology, mucus, viscoelasticity, optical tweezers (OT), mucins, rheology, biopolymer gels

OPEN ACCESS

Edited by:

Umberto D'Ortona,
UMR7340 Laboratoire de Mécanique,
Modélisation et Procédés Propres
(M2P2), France

Reviewed by:

Felix Campelo,
Instituto de Ciencias Fotónicas, Spain
Juan Guillermo Diaz Ochoa,
PERMEDIQ GmbH, Germany

*Correspondence:

Gladys Massiera
gladys.massiera@umontpellier.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Biophysics,
a section of the journal
Frontiers in Physics

Received: 30 October 2018

Accepted: 30 January 2019

Published: 19 February 2019

Citation:

Jory M, Bellouma K, Blanc C,
Casanellas L, Petit A, Reynaud P,
Vernisse C, Vachier I, Bourdin A and
Massiera G (2019) Mucus
Microrheology Measured on Human
Bronchial Epithelium Culture.
Front. Phys. 7:19.
doi: 10.3389/fphy.2019.00019

INTRODUCTION

The mucociliary function of bronchial epithelia ensures the continuous clearance of the airways. Mucus is a visco-elastic gel trapping dust and pathogens present in the inhaled air and thus acts as a protective barrier on top of the airway tissue. Its transport is a key element to ensure an efficient clearance of the respiratory system. It relies on two main elements: cilia beating coordination and mucus rheology.

Mucus are gels made of glycoproteins fibers that form a complex and heterogeneous viscoelastic network [1]. In the past, rheological characterization of airway mucus has been restricted to sputum or mucus from dead mammals because rheology methods require large volumes of sample (mL) and because of the difficulty of collecting human bronchial mucus. Models of human bronchial epithelium (HBE) culture have been developed these last decades [2–5]. While these models have been validated by biological factors demonstrating, for various pathologies, that the phenotype is conserved, a few studies [6–8] describe the physical characteristics of these models and in particular the mucus flowing properties. Even for these cultures, the amount of mucus that can be collected varies with the pathology and is in all cases very small. Typically, when secretion level is high, up to 1 mL can be collected during the 28 days of culture, but some cultures have such a small production that no mucus can be collected at all. Rheology can be performed at a microscale with several advantages: small volumes are required (min 10 μ L), it is a measure of the local response and therefore allows to investigate the heterogeneity of the sample, and finally it corresponds to probing how mucus flows at a relevant scale, the scale of a cilium. Common passive microrheology methods are based on the fluctuation-dissipation theorem and consist in using the thermal fluctuations of beads dispersed in the mucus to infer the elastic complex modulus, whereas active methods use optical or magnetic tweezers to apply local forces and measure the consequent deformation. Microrheological studies have been reported on horse airway mucus [9, 10], marine worm mucus [11], porcine respiratory mucus [1], and even human respiratory mucus [6, 12], using either active or passive methods. This literature reports two main findings. Probe size and probe/mucus interaction have to

be considered to correctly select the probe and perform reliable microrheological measurements [1]. More importantly, the mucus is described as a highly heterogeneous multi-scale network [10, 11] and conceptual models of mucus elastic structure are proposed: a coupled two-fluid model, or an interlinked scaffolds model. The high heterogeneity of the mucus renders their measurement and interpretation difficult. In particular, the collection of mucus itself could introduce a bias as it is limited to the upper fraction of the mucus layer, potentially the less elastic part as it is the easier part to collect. Moreover, mucus is sensitive to shear stress, pH, and extremely sensitive to water loss. The consequence could be that measurements performed on collected mucus give a less elastic response than mucus present on the epithelium.

In this paper, we use an original method that allows to measure microrheology and probe its variation with the distance from the epithelium, directly on HBE culture, thus avoiding any mucus collection. We will compare microrheology measurements performed on mucus collected from human bronchial cultures, collected during bronchoscopy, and measured on another epithelium model. We will discuss differences and relate them to mucus heterogeneity, adhesiveness and collection method. Finally, we will discuss the potential of this method for future studies and its potential use as a biomarker.

METHODS

Human Bronchial Epithelial (HBE) Cultures

Bronchial biopsies from control, smoker, and COPD subjects were collected during fiberoptic bronchoscopy on a subsegmental bronchus of the *left lower lobe* at *Arnaud de Villeneuve* hospital (Montpellier, France). All donors signed a consent form after being informed about the biomedical research on airway epithelium performed thanks to their donation. The protocol was approved by the institutional ethics commission of *Sud Méditerranée III* (CHRU Montpellier-AOI 9244–NCT02354677). Primary human bronchial epithelial cells were obtained from bronchial biopsy specimens and cultured under Air Liquid Interface (ALI) conditions [13] either with culture media provided by Lonza before January 2018, with a protocol adapted from Gras et al. [5] and Gamez et al. [14]; or with culture media provided by Stemcell Technologies after January 2018, with the manufacturer protocol. Briefly, bronchial epithelial biopsies were mechanically dissociated and suspended in bronchial epithelial growth medium (BEGM, Lonza or PneumaCult-Ex Plus, Stemcell Technologies). After an expansion phase in monolayers, cells were plated on uncoated nucleopore membranes (24-mm dia., 0.4 μm pore size, Transwell Clear, Costar) in a 1:1 mixture of BEGM and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) or with Pneumacult-Ex Plus until confluence. After confluence, the ALI phase can begin by applying media [a 1:1 mixture of BEGM and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) or with the PneumaCult ALI maintenance (Stemcell Technologies)] only at the basal side. Cells were cultured for 28 days to obtain a polarized and differentiated cell population with a mucociliary phenotype.

Mucus Collected From HBE Culture

For cultures with BEGM media, mucus, when efficiently produced by the culture, was gently collected with a micropipette every 2 days and stored at 4°C, for a maximum of 6 months. Typically, for one culture well, we obtained around 50 μL of secreted mucus after 2 days. For the cultures with Stemcell Technologies media, mucus is strongly stuck to the epithelium. To collect it, 60 μL of culture medium [PneumaCult ALI maintenance (Stemcell Technologies)] is spread on top of the culture well for 24 h. Then the medium is gently withdrawn. We apply then repeatedly a soft flow of media using a micropipette until some mucus detaches. Mucus is then collected from the medium with a micropipette and analyzed the same day. Typically, for one culture well, after 1 week, we obtained around 20 μL of mucus.

“Ex vivo” Mucus Samples From Clinical Examination

Mucus is collected during a bronchoscopy on healthy patients by blind soft aspiration through a catheter inserted up to 6–9th airway division always done by the same practitioner. The typical amount sampled is small, around 20 μL , and stored inside a 1.5 mL tube with water saturated air for transport. Samples containing blood are discarded. The chamber for microrheology analysis is prepared <2 h after mucus collection. Microrheology is performed straightaway.

Optical Tweezers Micro-Rheology Optical Tweezers

Our set-up is built on an inverted optical microscope LEICA DMI 3000 B supported by an air-damped anti-vibration table (Workstation Series, Melles Griot). The optical trap is generated by the focalization of a laser beam (1064 nm laser YLM 5W, from IPG Photonics) through an x100 (NA 1.4) oil immersion objective. The oscillating trap position is controlled thanks to a pair of acousto-optic deflectors (AA optoelectronic). Alternatively, for lower frequencies and higher laser intensity, the sample is moved thanks to a piezoelectric XY stage (Nano-Bio100 from MCL with a subnanometer accuracy). The trapped microsphere is imaged with a CCD camera Basler Scout-F. A multifunction Field Programmable Gate Array (FPGA) is used to control the different devices and acquire data through a LabVIEW homemade program. The bead position is obtained by image correlation analysis under LabVIEW at a sub-pixel resolution (≈ 4 nm). In our experiments, we typically impose $A_s = 1 \mu\text{m}$ or $A_s = 0.5 \mu\text{m}$ depending on the elasticity of our sample. We measure both A_b and φ for a range of frequency, f in between 0.09 and 50 Hz. All of our experiments are conducted at room temperature. Nevertheless, due to local heating of the laser, we measured that the temperature of the sample close to the trap could reach 30°C.

Principle

Microrheology was investigated using oscillating optical tweezers. Once an isolated bead is trapped with a laser, typical experiments consist in applying a small sinusoidal displacement either to the trap or to the sample. The motion of the bead

then gives information about the viscoelastic properties of the matrix at the driving frequency ω [15–17]. We consider now a displacement of the stage $x_s^* = A_s e^{j\omega t}$ (with A_s the amplitude of the stage displacement) and a fixed trap. In the linear regime, a bead of radius a follows the sinusoidal displacement with a phase shift φ , and its trajectory is given by $x_b^* = A_b e^{j\omega t} e^{-j\varphi}$ (with A_b the amplitude of the bead displacement). Following the analysis by Shundo et al. [17] and other authors, the complex shear modulus $G^* = G' + jG''$ is related to the ratio of the fluid forces acting on the bead to its displacement with respect to the fluid (taking into account a $6\pi a$ factor for a spherical bead). The fluid forces being opposed by the restoring harmonic force of the trap of stiffness k_{OT} , one gets:

$$G^* = \frac{k_{OT} x_b^*}{6\pi a (x_b^* - x_s^*)} = \frac{k_{OT} A_b e^{-j\varphi}}{6\pi a (A_b e^{-j\varphi} - A_s)}$$

and gives:

$$G' = \frac{k_{OT}}{6\pi a} \frac{A_b^2 - A_s A_b \cos \varphi}{A_b^2 + A_s^2 - 2 A_b A_s \cos \varphi}$$

$$G'' = \frac{k_{OT}}{6\pi a} \frac{A_s A_b \sin \varphi}{A_b^2 + A_s^2 - 2 A_b A_s \cos \varphi}$$

where G' and G'' are, respectively, the elastic and loss modulus.

To determine the absolute values of elastic moduli, the stiffness k_{OT} of the trap is required. We obtained k_{OT} using two different methods depending on samples. For weakly elastic mucus, the Gaussian distribution of the trapped bead position [18] is analyzed. For the most elastic samples, a strong laser intensity is required in order to trap the bead. As a consequence, the Brownian motion cannot be detected. We thus have calibrated the stiffness of the trap as a function of the power intensity in water using the drag force method [18]. In this case, we have hypothesized that the optical force is identical in mucus and in water. This hypothesis is supported by the fact that the optical index of the medium ($n \approx 1.335$) is very close to the water one, as measured using a refractometer. The laser optical path differs depending on the thickness and on the transparency of the sample, which can be affected by the presence of impurities (see **Figure S1**). We thus checked its effect on the laser trap stiffness and on its isotropy. As discussed in the Supplemental Information section, we show that the homogeneity of the laser trap is conserved through 100 μm of sample depth (**Figure S3**) but we observe a decrease of the laser stiffness around 35% (**Figure S2**), and that impurities play a minor role. We also discuss in Supplemental laser heating and temperature issues. The laser trap indeed causes a local heating of the sample ($<10^\circ\text{C}$). We thus checked that an increase in temperature of up to 7°C has little effect on the mucus viscoelasticity (**Figure S4**).

Chambers Preparation

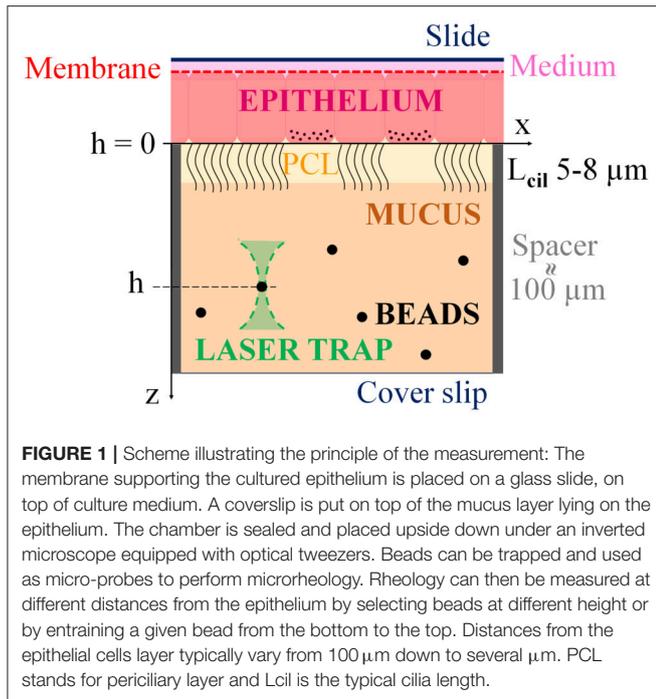
In order to work on isolated microspheres, the concentration of beads was chosen in order to have one bead per $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ in a 100 μm thick sample.

For the mucus collected from HBE cultures, carboxylated melamine resin beads, diameter 3 μm (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich), are dispersed in the collected supernatant mucus to a final concentration of 0.004 %v/v. Melamine resin beads, diameter 5 μm , and silica beads, diameter 1 and 4.5 μm , have also been tested and gave comparable results. The sample is then sandwiched in between two pegylated glass plates separated by a mylar spacer. The thickness of the spacer (100 or 175 μm) and the dimension of the chamber are chosen accordingly to the mucus volume available in order to minimize the residual air volume. To prevent evaporation, the chamber is immediately (in <2 min) sealed with a UV curable adhesive (ThorLabs NOA81). During Ultra-Violet (UV) exposure, the sample is protected by a reflector (aluminum foil). For “*in vivo*” mucus, we proceed exactly the same way.

For measurements performed on HBE cultures, 0.5 μL of the 0.4 %v/v bead solution are firstly mixed with mucus collected from the culture wells ($\sim 50 \mu\text{L}$). The culture membrane is then cut and deposited on a 3 μL volume of culture medium on a glass slide as illustrated in **Figure 1**. Mucus containing beads is then gently spread on the epithelium and covered with a cover slip onto which a spacer was previously fixed. Three spacers have been tested: (i) silica debris of $60 \pm 10 \mu\text{m}$ distributed approximately every 500 μm ; (ii) adhesive circular spacers (Grace Bio-Labs, 654004), 13 mm in diameter and 120 μm in thickness together with a $4 \times 4 \text{mm}^2$ central piece; (iii) UV curable adhesive squared pillars of $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ and 100 μm in height, distributed every 0.5 mm and produced using microlithography. The chamber is immediately UV sealed as previously described, in <5 min after membrane cutting. The sample is left to rest 30 min before performing the experiment.

Experimental Method on HBE Cultures

Experiments are conducted no longer than 3 h, during which average of 15 experiments can be performed. We observed cell death after 1 h under the microscope with a laser on at 0.1–1 W. We checked that measurements performed at the same height h , at 1 and 2 h, gave overlapping results. The distance h separating the bead from the epithelium was measured using the microscope fine focus graduations (2 μm). For each measurement, a bead is selected and trapped close to the cover slip (far from the epithelium) and used to measure the rheological response at this height. The bead is then gradually dragged to different heights in the direction of the epithelium and the distance h_c to the coverslip is recorded for each rheological measurement. The distance between the coverslip and the tissue, h_t , is measured once the bead reached the cell tissue and is used to compute h , the distance between the bead and the epithelium: $h = h_t - h_c$. The distance h_t is measured for each bead at the end of the experiment since it cannot be removed from the epithelium once it contacted it. For each experiment, the bead is dragged to a given height h , and we then wait a minimum of 3 min before measurement, to allow stress relaxation (see **Figure S5**). A measurement is performed every 10 μm approximately when possible: the number of heights per bead is limited by bead loss during the dragging or during the measurement. To evaluate the



robustness of our results and explore our samples heterogeneity, a height sweep is performed with at least three different beads, taken at different xy locations, and dragged to several heights. On average, 15 measurements are obtained by chamber. In most cases, a few heights are obtained per beads. We then use more beads to increase our statistics. When measuring microrheology close to the epithelium, cilia beating hinder proper rheology measurement. We thus need areas without beating cilia. In the case of BEGM cultures, the density of beating ciliated cells is low (<20%), and we simply worked in areas without beating. In the case of Pneumacult cultures, cilia density is high (60–80%). We locally stopped cilia beating activity by focalizing the laser on ciliated cells at 2.5W for around 5 s, on an area of a few micrometers.

RESULTS

Mucus collection from cultured wells depends on the mucus flowing properties, which could introduce a bias in their characterization. Indeed, withdraw is easier when the mucus is poorly elastic and is in all cases limited to the mucus layer far from the epithelium to avoid damaging of the culture. To measure the microrheology response within the mucus layer lying on top of cultured HBE and probe its variation with the distance to the epithelium, we developed a new protocol and adjusted our setup. **Figure 1** illustrates the principle of the experiment: Beads are dispersed in the mucus layer as described in the methods section. An optical tweezer is used to trap a bead at a given height in the chamber. The selected bead is then used as a rheological probe: a deformation is applied by oscillating the bead and measuring the resulting force. The elastic G' and loss G'' moduli can be computed

as detailed in the method section. Rheology can be measured at different distances from the epithelium by selecting beads at different heights in the mucus layer or by entraining a given bead from the bottom to the top. Distances from the epithelial cells layer typically vary from 100 micrometers down to several micrometers.

Figure 2 compares the rheological response measured directly on the culture and on the mucus collected from the same epithelium (named “bulk” in the following). The elastic moduli $G'(f)$ and $G''(f)$ are represented on a log-log plot over a decade of frequency f , from 0.09 to 1.1 Hz, and are fitted with a power law function. In “bulk,” we find the hallmarks of a viscous fluid: G'' is 10x larger than G' , and both moduli can be fitted by a power law with exponents very close to 1. Their values correspond to a fluid ~ 10 times more viscous than water. Results obtained on the culture drastically differ in amplitude, by 2 to 3 orders of magnitude, and G' is now larger than G'' for $h < 20 \mu\text{m}$ approximately. The response also evolves with the distance probe-epithelium. The power law exponents are much lower when the probe gets closer to the epithelium layer ($\approx 10 \mu\text{m}$): 0.2 for G' and 0.57 for G'' . Within the mucus layer, when the probe distance h from the epithelium is varied from close (a few microns) to far ($> 50 \mu\text{m}$), we observe that the mucus rheological response evolves gradually from the response of a viscoelastic to a viscous fluid, as illustrated in **Figure 3** for four cultures obtained from three different biopsies: two smokers (Patient 1 and 3) and a control (Patient 2). On **Figure 3**, each type of symbol corresponds to a measurement performed with a different bead, i.e., a different xy location on the epithelium. Due to the bead loss during dragging or measurement, measurements can only be performed for a few heights per bead (**Figure 3A**). Nevertheless, we obtain that different beads at the same height give similar results, as illustrated in **Figure 3D** with the overlap of the curves in red at $h = 14 \mu\text{m}$ (squares and diamonds) or also the curves in pink at $h = 22 \mu\text{m}$ (diamonds and triangles up). BEGM cultures thus seem homogeneous in the xy plan. The power law exponent α measured on $G'(f)$ is plotted as a function of h and increases with the distance to the epithelium, clearly showing that mucus is less elastic far from the epithelial layer (**Figure 3E**). The robustness of our results is shown by measuring microrheology on two different wells obtained from the same biopsy (Patient 3). Data are consistent (**Figures 3C,D**) and result in the same slope for α vs. h (**Figure 3F**).

To evaluate how these data obtained from a model of bronchial epithelium can be compared to the rheological response of mucus “*ex vivo*,” we performed microrheology on mucus extracted from bronchia during clinical examination. Collecting mucus inside bronchia is challenging. Nevertheless, on some occasions, tiny amounts could be obtained, enough to be probed by microrheology. All of our data are reported in **Figure 4**, for seven patients. These samples contain a large quantity of floating cells. Therefore, in our results description, we consider two distinct cases as illustrated in **Figure 4**: Case I (squares), the probe is in the vicinity of an aggregate, at least $3 \mu\text{m}$ away, and Case II (circles), the probe is far ($> 15 \mu\text{m}$) from cells, in a transparent region, as illustrated in **Figure S6**. Elastic moduli vs. frequency curves, corresponding

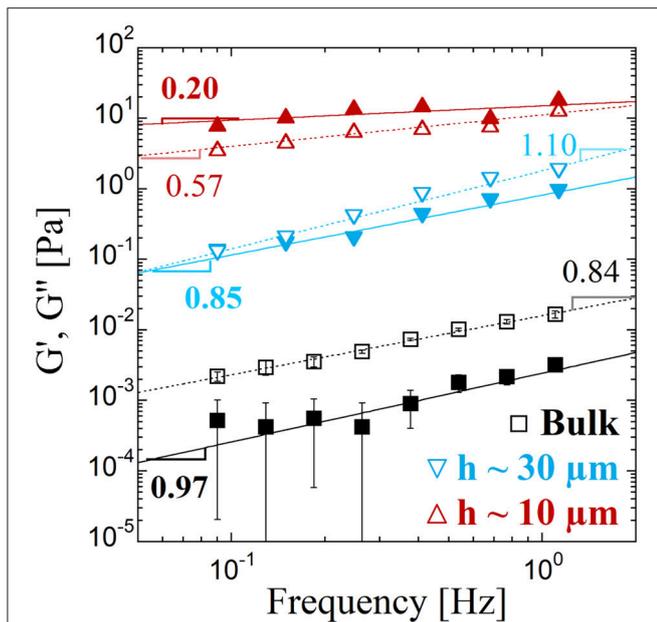


FIGURE 2 | Microrheology of mucus from a bronchial epithelium culture: The elastic G' (filled symbols) and loss G'' (empty symbols) moduli are represented as a function of the frequency f . For the same culture, measurements are performed for mucus withdrawn from the epithelium (squares), noted as “bulk” and directly on the epithelium (triangles). For measurements performed on the culture, the approximate distance separating the bead from the epithelium is indicated for each symbol. Error bars correspond to min-to-max values obtained on measurements performed in “bulk” ($N = 4$). The solid and dotted lines are fits with a power law function of, respectively, $G'(f)$ and $G''(f)$. The power law exponent is indicated on the figure with an uncertainty of ± 0.05 and power law amplitudes $G_0 = G'(f = 1 \text{ Hz})$ are equal, in Pa, to $G'(0.002; 0.82; 15.12)$ and $G''(0.02; 1.81; 11.25)$ for respectively, the bulk, $\Delta h \approx 30 \mu\text{m}$, and $\Delta h \approx 10 \mu\text{m}$.

to 11 different measurements, cover almost 5 decades. The curves corresponding to Case I, with a probe in the vicinity of cell aggregates, have amplitudes varying from 0.4 to 30 Pa and power law exponents in between 0.01 and 0.5, G' being always greater than G'' . These are hallmarks of an elastic complex fluid. Case I curve is close to an elastic plateau at 5 Pa, while curves corresponding to probes far away from cells (Case II) are closer to what we obtain for measurements in “bulk”: a viscous response with G'' greater than G' , small moduli with power law exponents close to 1.

Figure 5 gathers all the results previously presented, highlighting two families of curves: rheology curves reflecting the viscous nature of the mucus measured in “bulk” or “*ex vivo*” for probes isolated from cell aggregate, and a second family of curves highlighting the elastic nature of the mucus for experiments performed on culture wells with a probe close to the epithelium, or when the probe is located near surfaces or cellular structures for mucus collected from HBE culture and “*ex vivo*” mucus samples, respectively.

Again with the objective of evaluating the HBE culture model from the physical perspective, we compare the mucus flow properties of two HBE cultures which differ by the culture

method and in particular the culture medium used to feed the cells as described in the method section. In the following, we will name these two models “BEGM” and “Pneumacult,” using the names of the culture media used for each method. The results that have been described so far all correspond to the “BEGM” culture model. **Figure 6** gather the microrheological measurements obtained “in bulk” with $N = 4$ “Pneumacult” and $N = 10$ “BEGM” cultures (**Figure 6A**), and obtained on the culture with $N = 2$ and $N = 4$ for, respectively, “Pneumacult” and “BEGM” cultures (**Figure 6B**). The elastic moduli value and dependence on the frequency f are considerably different for the two models, and even more obviously when mucus is probed “in bulk”. “BEGM” mucus, as previously described, has the hallmarks of a viscous fluid “in bulk” and behave as an elastic fluid close to the epithelium. “Pneumacult” mucus is highly elastic with an elastic plateau at 8 Pa “in bulk”. On HBE “Pneumacult” cultures, mucus rheology (**Figure 7**) is characterized by power law exponents in the range 0.3–0.5 and elastic moduli values spanning two decades [$G'(f = 1 \text{ Hz}) = 0.7\text{--}70\text{Pa}$], without any correlation with the distance h to the epithelium (**Figures 7B,C**). The power law exponent (the degree of elasticity vs. viscosity) is a constant function of h , around 0.3–0.5 (**Figure 7B**), except for distances to the epithelium $< 10 \mu\text{m}$, for which α surprisingly reaches values as high as 1. Because of the high beating activity for “Pneumacult” cultures, we consider with caution results obtained for $h < 10 \mu\text{m}$, which probably corresponds to distance to cilia $< 5 \mu\text{m}$. “Pneumacult” measurements on HBE cultures do not display the continuous increase in α with the distance h to the epithelium that we obtained on “BEGM” HBE cultures. It is important though to mention here that these two culture methods result in remarkably different epithelia features. “Pneumacult” cultures have much more beating ciliated cells and a lower production of mucus with a thicker and more elastic aspect. The mucus observed on “Pneumacult” culture contains numerous cellular debris (see **Figure S1D**) and is highly inhomogeneous (**Figure 7D**), while mucus from “BEGM” culture is transparent, and floating cells are observed only on some occasions (see **Figures S1A,C**).

DISCUSSION

Difficulties in characterizing human airway mucus are essentially related to the small amount of high quality physiological mucus that can be collected [19–21]. To respond to the requirement of measuring rheology on small volumes of mucus, novel techniques named microrheology have been proposed [1, 10, 22]. However, the collection of mucus itself could lead to a biased picture of the *ex vivo* mucus properties as only the supernatant mucus can be collected. The less elastic, the easier it is to collect the mucus. The consequence could be that collected mucus is less elastic than the one on the epithelium. In addition the mucus as a layered structure with a gel phase on top of a periciliary watery layer [19]. To measure how microrheology vary within the mucus layer lying on top of cultured bronchial epithelium and probe its variation with the distance from the epithelium, we developed a new protocol and implemented our setup.

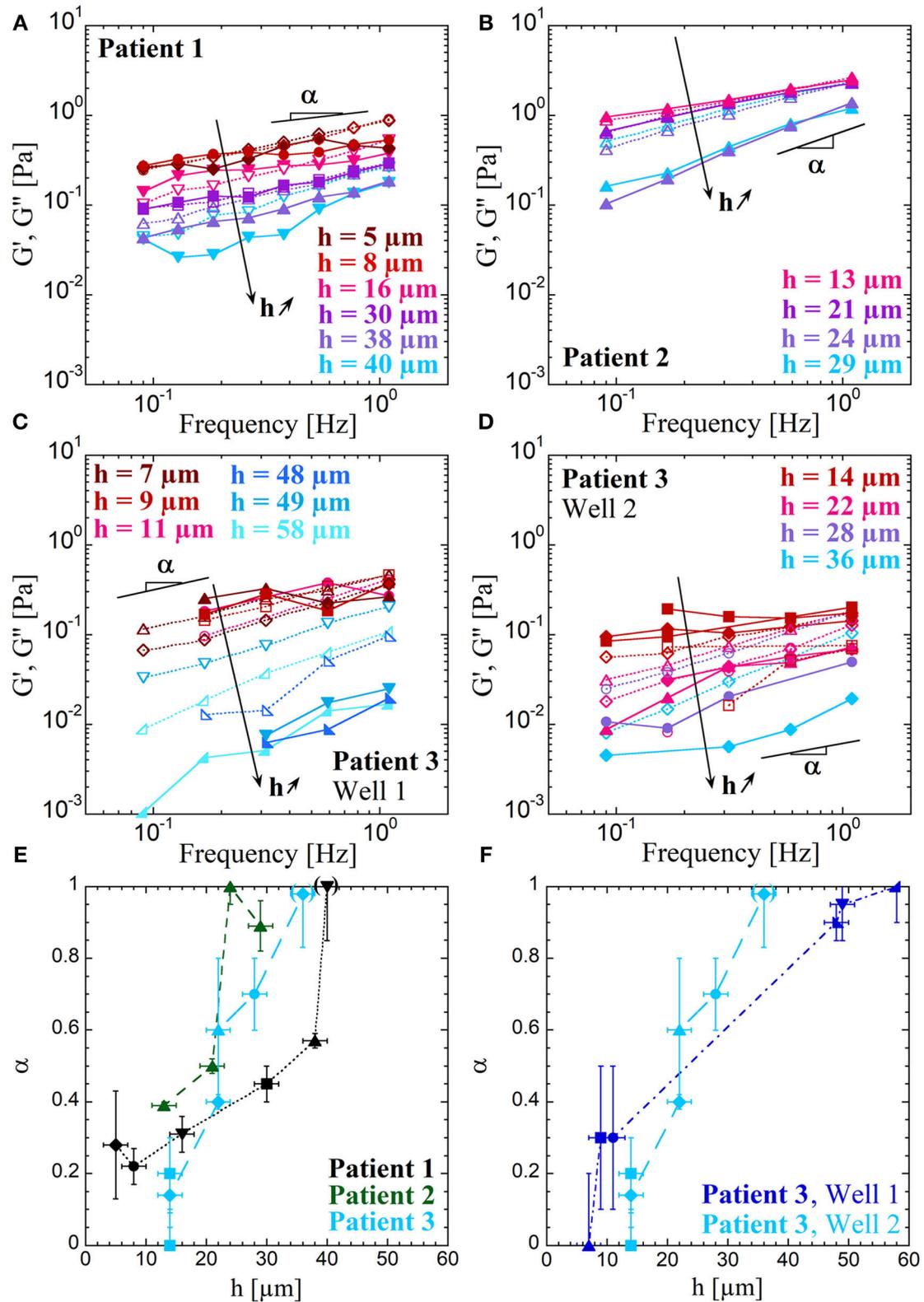


FIGURE 3 | Variation of the microrheology response with the distance to the epithelium: The elastic G' (filled symbols and solid lines) and loss G'' (empty symbols and dotted lines) moduli are represented as a function of the frequency f in panels (A–D). Measurements are performed by entraining beads from the bottom to the top. (Continued)

FIGURE 3 | Each symbol corresponds to a different bead. The four bronchial epithelia are cultured starting from biopsy of a smoker (Patient 1) for (A), a control (Patient 2) for (B) and two wells obtained from the same smoker (Patient 3) for (C,D). Power law exponents α of $G'(f)$ are represented in panels (E,F) as a function of the distance h from the epithelium cells layer, with in (E) the three patients: Patient 1 (black, dotted line), Patient 2 (dark green, short dashed line) and Patient 3 (light blue, long dashed line); and in (F) the comparison between two wells of Patient 3: well 1 (dark blue, dotted and dashed line) and well 2 (light blue, long dashed line). Each symbol corresponds to different beads and are kept identical to the corresponding data of panels (A–D). Error bars report on errors on the height h and on the determination of α by fitting $G'(f)$ by a power law. The parentheses around some points at $h > 30 \mu\text{m}$ indicate inaccurate values of α when the behavior of the corresponding curve $G'(f)$ is not a power law.

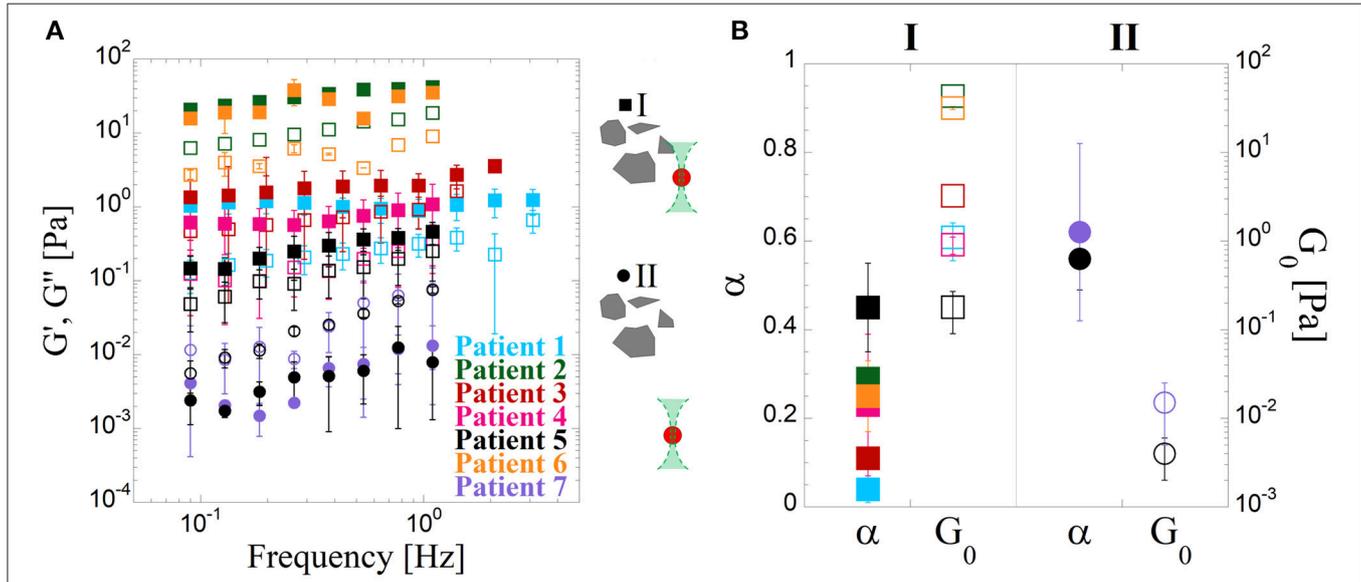


FIGURE 4 | Microrheology of mucus collected from bronchia during a patient examination. (A) The elastic G' (filled symbols) and loss G'' (empty symbols) moduli are represented as a function of the frequency f . The 9 reported curves correspond to different patients and cases. Since “*ex vivo*” mucus contains a lot of cell debris, measurements have been performed in different locations: with the probe in the vicinity (between 3 and $10 \mu\text{m}$) of cellular structures (Case I, squares), and with the probe away (more than $15 \mu\text{m}$) from cellular structures (case II, circles). The data reported for each curve correspond to the averaged G' and G'' on N measurements performed on the same sample (patient) but for different bead locations and distinct cases (I and II). Error bars correspond to min-to-max values obtained from N measurements. Case I, patients #1–6, $N = 3, 1, 4, 5, 4, 2$; Case II, patient #5&7 $N = 5, 4$. (B) Power law exponent α (filled symbols) and amplitude G_0 (empty symbols) of $G'(f)$ for the 2 cases, II (squares) and III (circles). The values are obtained by a power law fit of the 9 reported curves in panel A of elastic modulus G' as a function of the frequency f . Colors refer to the different patients and bars correspond to min-to-max values obtained from N measurements.

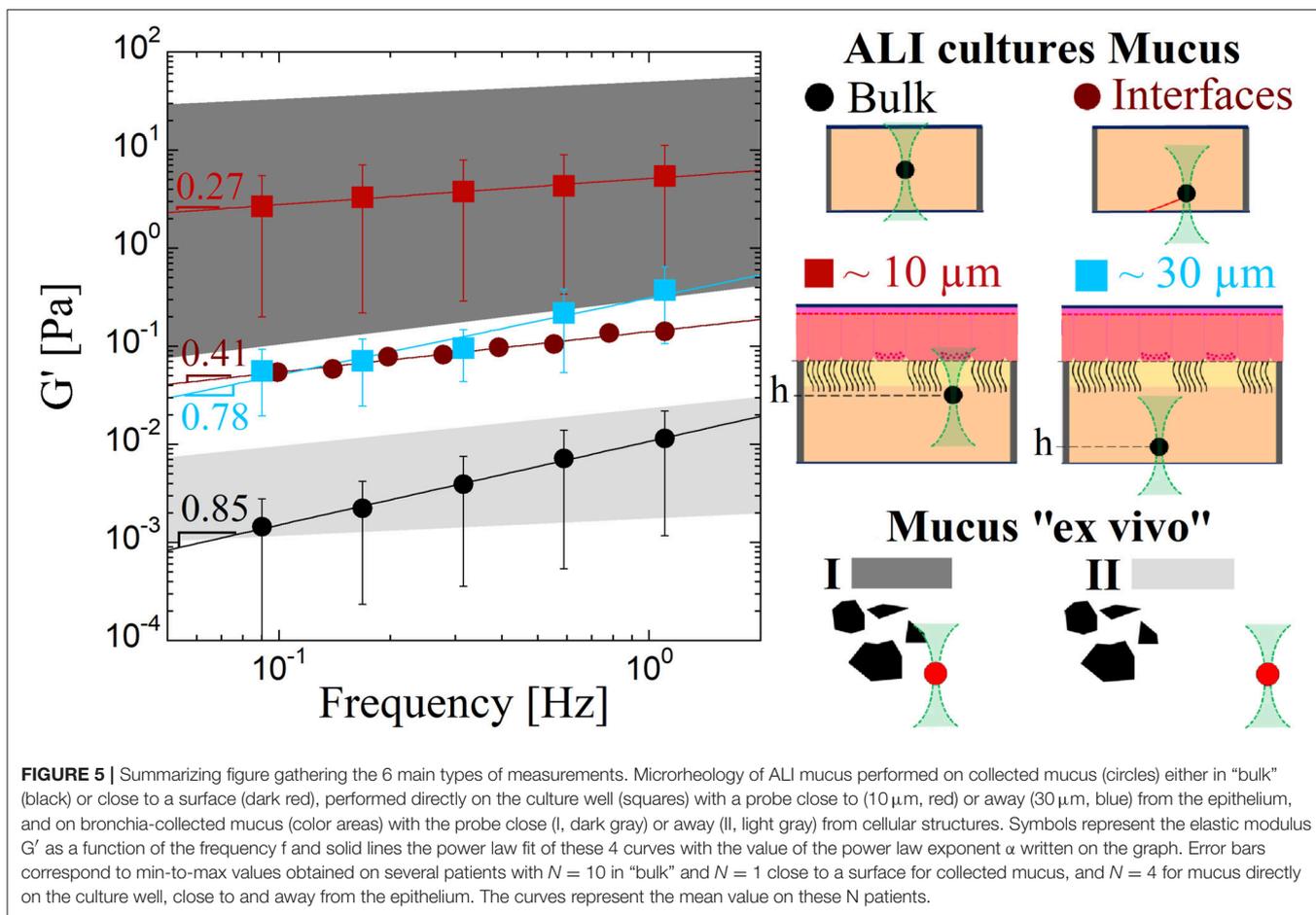
Collected Mucus and Mucus on the Epithelium Have a Different Microrheology Response

Recent papers are focused on the mucus rheology and compare the rheological response of mucus measured at the macro-scale using standard rheometers to measurements performed at a microscale [9–12, 23]. These studies have been performed on mucus of various origin: horse airway mucus [9, 10], marine worm mucus [11], porcine respiratory mucus[1], and even HBE mucus [6, 12], using either active or passive methods for microscale measurements. It is shown that probe size and probe/mucus interaction have to be considered to correctly select the probe and perform reliable microrheological measurements [1]. Furthermore, mucus appears as a highly heterogeneous multi-scale network with coupled two-fluid or interlinked scaffolds models being proposed [10, 23]. Micro and macro-rheology consequently result in different behaviors and values [10, 12, 23]. In addition to the scale at which mucus rheology is probed, we discuss here how mucus collection can

introduce a bias. We show, using mucus from the same well, that mucus measured once collected and measured directly on the epithelium have very different responses. Elastic moduli are several orders of magnitude larger on the epithelium with an elastic response rather than a viscous behavior as for the “bulk” case (Figure 2). This confirms that mucus collection is delicate and might lead to a misinterpretation of the results as only the less elastic fraction of mucus can be withdrawn from the epithelium.

Microrheology Gradually Varies Within the Mucus Layer on the Epithelium From Elastic to Viscous

More importantly, we find that the mucus rheology is not homogeneous but consistently varies from elastic to viscous when probed at increasing distances from the epithelium (Figure 3). The viscoelastic moduli G' and G'' variation with the frequency f is used to quantify and analyse the mucus viscoelastic response. We consider three main features of $G'(f)$

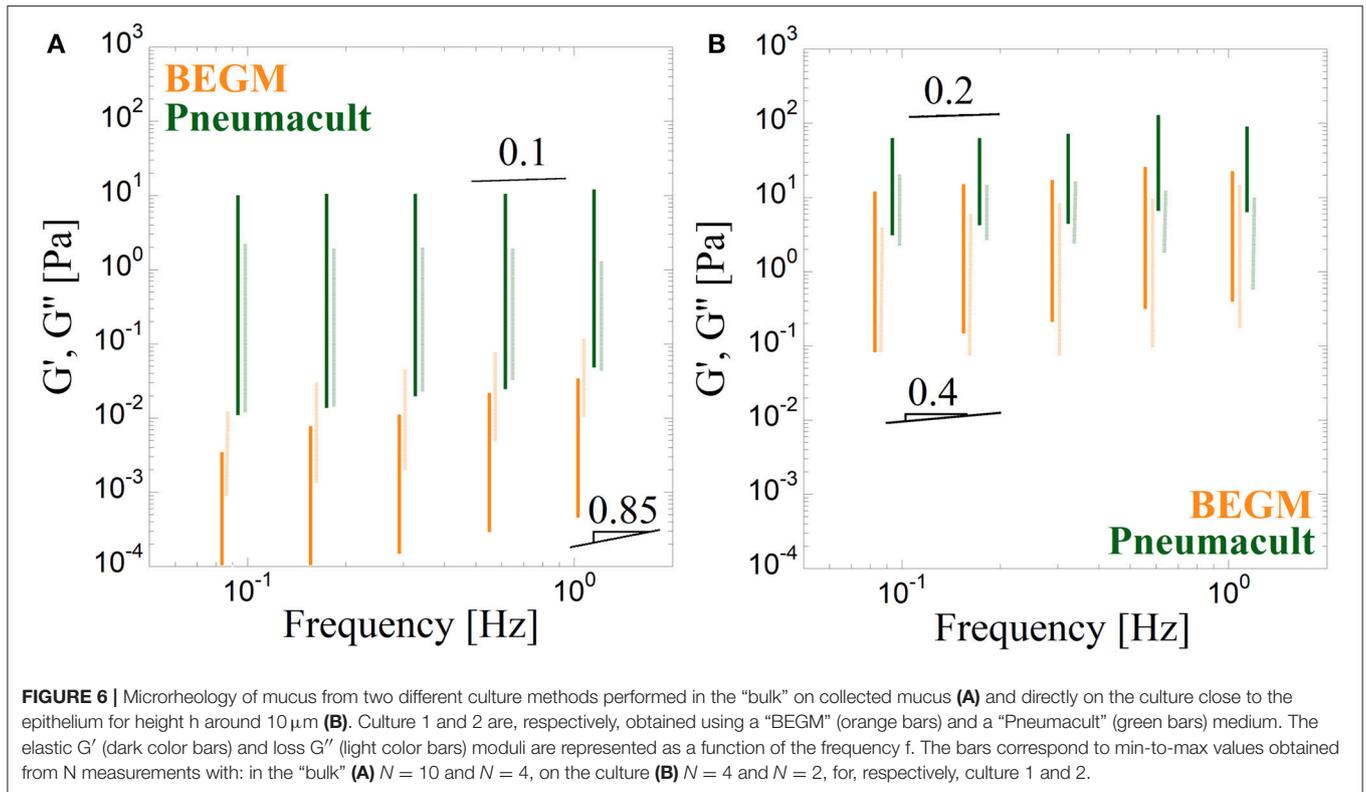


and $G''(f)$: the amplitude of the elastic moduli $G_0 = G'(f = 1 \text{ Hz})$, that give the viscoelasticity level; the ratio G'/G'' , and the power law exponent α , which both are a measure of the elastic vs. viscous character of the complex fluid. In particular, the exponent α is expected to be equal to 1 when the fluid is purely viscous and to 0 for a purely elastic solid. α increases roughly linearly with the distance h to the epithelium thus going from an elastic to a viscous behavior. The rate at which the behavior goes from elastic to viscous with the distance h is highly dependent on the culture, but the variation in α for two wells obtained from the same biopsy consistently overlaps (Figure 3F), bringing robustness to our results. This is the first demonstration of a gradient in viscoelasticity in the mucus layer of bronchial epithelium, even if the hypothesis has been present in the literature for long in particular because of its layered structure [19].

Mucus "ex vivo" Collected From Bronchia Contains a Lot of Cell Debris That Affect the Microrheology Response

All the difficulties related to collecting native mucus have restricted mucus physical and biochemical studies to sputum for which it is difficult to prevent saliva contamination. Some

techniques have been proposed to measure mucus collected during bronchofibroscopy allowing to collect mucus sample without saliva but they are extremely constrained [19]. We attempt to characterize the flowing properties of mucus collected from human bronchia by simple aspiration during a clinical examination. We obtain a very broad set of data (Figure 4) probably due to the variability of the mucus, and of its collection. Cell debris are present in large amount and contribute to the microscale rheology measurements. The rheology response, indeed, essentially depends on the probe vicinity to cellular structures. Far from any structure, elastic moduli are consistent with what we find for mucus collected from HBE: the rheology corresponds to a medium of viscosity equal to 2–20 times the water viscosity (Figure 4). Close to cellular structure, our results are rather consistent with the elastic behavior obtained on mucus collected from HBE when the probe is close to surfaces such as the glass plate. We hypothesize as discussed in another publication [19], that this elastic response occurs thanks to filaments-like structures that could form when the probe contacts any surface because of the highly adhesive nature of the mucus. Mucus is composed of mucins, proteinglycans, lipids, that interact together to form a gel network, but that also interact with cilia and other cellular structures. Flow properties of these "ex vivo" samples can be subjected to various contributions affecting rheology such



as water loss, collection method, or collection region, stress induced hypersecretion, tissue damage. We thus consider that these measurements are only indicative of what could be the bronchia mucus microrheology.

Figure 5 summarizes all of our results and show that depending on how mucus is measured, G' and G'' fall on one of two families of curves: curves corresponding to a viscous behavior with low value of the moduli or curves corresponding to an elastic behavior with lower exponent and higher moduli values. Collection of mucus seems to have a huge role on the type of behavior that is obtained as a result without being strictly related to the bronchia mucus properties. Measuring the viscoelastic moduli as a function of the frequency directly on the epithelium seems to be the most reliable way to evaluate the microrheological response of respiratory mucus.

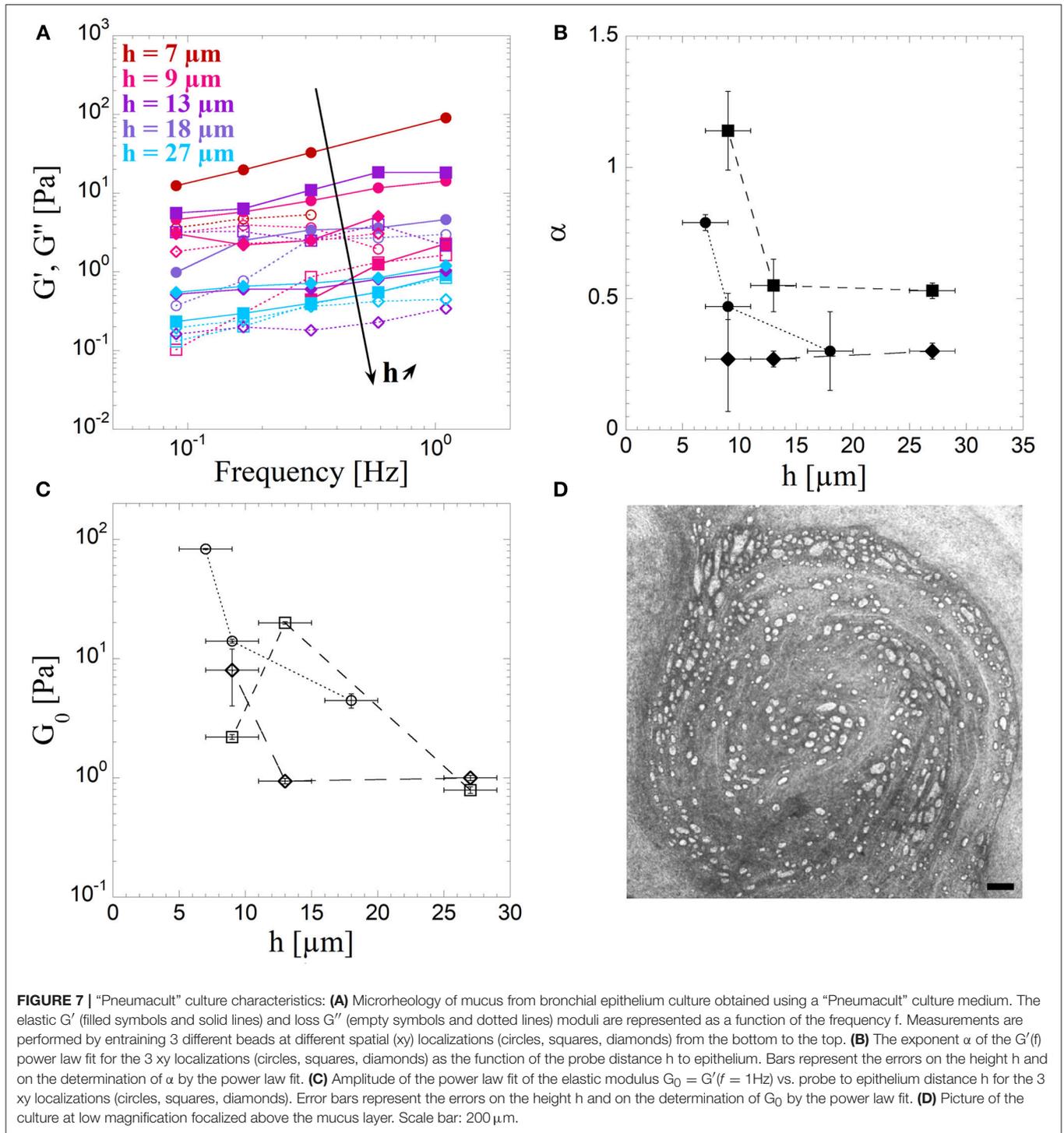
On the Role of the Culture Method on Physical Features of the Human Bronchia Epithelium: “BEGM” and “Pneumacult”

Finally, we compared two methods of culture, essentially differing in the culture media used to feed the cells “BEGM” and “Pneumacult”. They give different results both on collected mucus and when rheology is measured on the epithelium (**Figure 6**). This is in agreement with macroscopic observation of the samples, as the mucus from “Pneumacult” culture appears as highly elastic and sticky in comparison with “BEGM” mucus. These first experiments show that the gradual variation observed on the whole mucus layer for “BEGM” culture is not found for “Pneumacult” culture (**Figure 7**). On the reverse, the elasticity

is always high and does not seem to be as dependent on the distance to the epithelium. This has to be confronted to the very high heterogeneity of this mucus and to the large number of cell debris it contains. This culture method which is the one used in our group since January 2018, provides epithelia which are singularly different in its physical characteristics, while it has been proven to represent a reliable and robust model of respiratory epithelia by means of biological markers and tissues characterization [24, 25]. Pneumacult cultures are probably more physiologically relevant since epithelia are much more active with a density of beating cells probably closer to *in vivo* tissues. Nevertheless, the mucus is produced in much lower quantity and difficult to collect. The presence of cells alters mucus rheology determination. Overall, BEGM cultures were an easier tool to investigate mucus rheology on culture and to show robustly the existence of a variation in the viscoelastic behavior with the distance to the epithelium, which was never assessed before. Pneumacult cultures because of heterogeneity do not exhibit such a clear variation and need more biological investigation to be considered as a good biological model. Further investigations on these culture are to be performed to analyze other physical characteristics such as cilia beating and mucus flow [7].

CONCLUSION

Mucus is a complex biofluid that fulfills numerous biological functions. Among its physical properties, rheology is crucial to understand how mucus flow is generated in the mucociliary system. Mucus collection to evaluate its physical properties



results in very small volumes of a selected fraction of mucus because of mucus high heterogeneity and interaction with the epithelium. Collected mucus is consequently poorly representative of native mucus rheology. We took full advantage of the human bronchial epithelia models developed thanks to air-liquid interface cultures and developed an original method to measure mucus rheology directly on the epithelium. Our

main experimental findings are that beside the heterogeneous structures formed by the mucus, which remains difficult to decipher, mucus rheological response varies, for BEGM cultures, from an elastic behavior close to the epithelium to a viscous one far away, and with up to a two-fold decrease in elastic moduli on distances to the epithelium from 10 to 50 μm . On Pneumacult cultures which are now the one available, similar experiments

need to be performed at an earlier stage, before cilia density becomes too high. Our findings could now be used at various levels to understand how this variation in elasticity with the distance to the epithelium could contribute to mucus transport when coupled to cilia beating. On a clinical point of view, it is not obvious at this stage if this method could be used for diagnosis as a clinical marker, mainly because experiments are delicate and time consuming. On a more fundamental point of view though, these experimental results could now be used in numerical models [26, 27] describing the whole epithelium, and in particular the emergence of metachronal waves and mucus transport thanks to cilia beating in a mucus with elastic properties varying with the distance to the epithelium.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IV, AB, and GM conceived the project. MJ, LC, IV, AB, and GM coordinated the experimental and data analysis activity. AP

and CV provided cultures. PR performed bronchoscopies. CB developed the optical tweezers and adapted it to microrheology experiments. MJ, CB, and KB performed experiments. MJ analyzed data. GM wrote the first draft of the manuscript. MJ and CB wrote sections of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

FUNDING

Labex Numev, FSNR AAP2015-2-053, Vaincrelamucoviscidose AP2016 RF20160501673, ANR Mucocil 13-BSV5-0015.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2019.00019/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Lai SK, Wang YY, Wirtz D, Hanes J. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* (2009) **61**:86–100. doi: 10.1016/j.addr.2008.09.012
- Gras D, Petit A, Charriot J, Knabe L, Alagha K, Gamez AS, et al. Epithelial ciliated beating cells essential for *ex vivo* ALI culture growth. *BMC Pulm Med.* (2017) **17**:1–7. doi: 10.1186/s12890-017-0423-5
- Leslie Fulcher M, Gabriel S, Burns KA, Yankaskas JR, Randell SH. Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Hum Cell Cult Protoc.* (2005) **107**:183–206. doi: 10.1385/1-59259-861-7:183
- Liu Y, Fire AZ, Boyd S, Olshen RA. Rescue of CF airway epithelial cell function *in vitro* by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) **106**:18825–830. doi: 10.1016/j.pnas.2014.05.008
- Gras D, Bourdin A, Vachier I, De Senneville L, Bonnans C, Chanez P. An *ex vivo* model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol.* (2012) **129**:1259–1266.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.073
- Hill DB, Vasquez PA, Mellnik J, McKinley SA, Vose A, Mu F, et al. A biophysical basis for mucus solids concentration as a candidate biomarker for airways disease. *PLoS ONE* (2014) **9**:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0087681
- Khelloufi MK, Loiseau E, Jaeger M, Molinari N, Chanez P, Gras D, et al. Spatiotemporal organization of cilia drives multiscale mucus swirls in model human bronchial epithelium. *Sci Rep.* (2018) **8**:1–10. doi: 10.1038/s41598-018-20882-4
- Feriani L, Juenet M, Fowler CJ, Bruot N, Chioccioli M, Holland SM, et al. Assessing the collective dynamics of motile cilia in cultures of human airway cells by multiscale DDM. *Biophys J.* (2017) **113**:109–19. doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.028
- Bokkasam H, Ernst M, Guenther M, Wagner C, Schaefer UF, Lehr CM. Different macro- and micro-rheological properties of native porcine respiratory and intestinal mucus. *Int J Pharm.* (2016) **510**:164–7. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.035
- Kirch J, Schneider A, Abou B, Hopf A, Schaefer UF, Schneider M, et al. Optical tweezers reveal relationship between microstructure and nanoparticle penetration of pulmonary mucus. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2012) **109**:18355–60. doi: 10.1073/pnas.1214066109
- Weigand WJ, Messmore A, Tu J, Morales-Sanz A, Blair DL, Deheyn DD, et al. Active microrheology determines scaledependent material properties of *Chaetopterus* mucus. *PLoS ONE* (2017) **12**:1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0176732
- Schuster BS, Suk JS, Woodworth GF, Hanes J. Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Biomaterials* (2013) **34**:3439–46. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.064
- Jeffery P, Holgate S, Wenzel S. Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* (2003) **168**:S1–17. doi: 10.1164/rccm.200202-150WS
- Gamez AS, Gras D, Petit A, Knabe L, Molinari N, Vachier I, et al. Supplementing defect in club cell secretory protein attenuates airway inflammation in COPD. *Chest* (2015) **147**:1467–76. doi: 10.1378/chest.14-1174
- Tassieri M, Gibson GM, Evans RML, Yao AM, Warren R, Padgett MJ, et al. Measuring storage and loss moduli using optical tweezers: Broadband microrheology. *Phys Rev E* (2010) **81**:1–5. doi: 10.1103/PhysRevE.81.026308
- Tassieri M, Del Giudice F, Robertson EJ, Jain N, Fries B, Wilson R, et al. Microrheology with optical tweezers: Measuring the relative viscosity of solutions “at a glance.” *Sci Rep.* (2015) **5**:1–6. doi: 10.1038/srep08831
- Shundo A, Hori K, Penalzoa DP, Tanaka K. Optical tweezers with fluorescence detection for temperature-dependent microrheological measurements. *Rev Sci Instrum.* (2013) **84**:14103. doi: 10.1063/1.4789429
- Neuman KC, Block SM. Optical trapping. *Rev Sci Instrum.* (2004) **75**:2787–09. doi: 10.1063/1.1785844
- Girod S, Zahm JM, Plotkowski C, Beck G, Puchelle E. Role of the physiochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. *Eur Respir J Off J Eur Soc Clin Respir Physiol.* (1992) **5**:477–87.
- Jeanneret-Grosjean A, King M, Michoud MC, Liote H, Amyot R. Sampling technique and rheology of human. *Am Rev Respir Dis.* (1988) **137**:707–10.
- Zayas JG, Man GCW, King M. Tracheal mucus rheology in patients undergoing diagnostic bronchoscopy interrelations with smoking and cancer. *Am Rev Respir Dis.* (1989) **141**:1107–13.
- King M, Macklem PT. Rheological quantities properties of microliter of normal mucus. *J Appl Physiol Respir Exerc Physiol.* (1977) **42**:797–802.
- Gross A, Torge A, Schaefer UF, Schneider M, Lehr CM, Wagner C. A foam model highlights the differences of the macro- and microrheology of respiratory horse mucus. *J Mech Behav Biomed Mater.* (2017) **71**:216–22. doi: 10.1016/j.jmbm.2017.03.009
- Gohy ST, Hupin C, Pilette C, Ladjemi MZ. Chronic inflammatory airway diseases: the central role of the epithelium revisited. *Clin Exp Allergy* (2016) **46**:529–42. doi: 10.1111/cea.12712

25. Gohy ST, Hupin C, Fregimilicka C, Detry BR, Bouzin C, Chevronay HG, et al. Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition. *Eur Respir J.* (2015) **45**:1258–72. doi: 10.1183/09031936.00135814
26. Chatelin R, Anne-Archard D, Murris-Espin M, Thiriet M, Poncet P. Numerical and experimental investigation of mucociliary clearance breakdown in cystic fibrosis. *J Biomech.* (2017) **53**:56–63. doi: 10.1016/j.jbiomech.2016.12.026
27. Chateau S, Ortona UD, Poncet S, Favier J, David T. Transport and mixing induced by beating cilia in human airways. *Front Physiol.* (2018) **9**:161. doi: 10.3389/fphys.2018.00161

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Jory, Bellouma, Blanc, Casanellas, Petit, Reynaud, Vernisse, Vachier, Bourdin and Massiera. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Mucus microrheology measured on human bronchial epithelium culture

Myriam Jory¹, Karim Bellouma¹, Christophe Blanc¹, Laura Casanellas, Aurélie Petit², Paul Raynaud², Charlotte Vernisse², Isabelle Vachier², Arnaud Bourdin², Gladys Massiera^{1,*}

¹L2C, Univ Montpellier, CNRS, 34095 Montpellier, France

²PhyMedExp, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Department of Pneumology and Addictology, Montpellier University Hospital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France

Supplementary Material

1 Methodology

1.1 Optical tweezers for biological samples

The use of optical tweezers for microrheology involves various experimental subtleties and even more specifically when used with biological samples. We discuss here some technical aspects that required to be checked to validate our experimental approach.

Probe size and chemistry. The size of the probe (bead) a has an impact on the laser stiffness k and on the viscoelastic moduli determination (see formula in the main text). For accurate measurements a determination of the bead size a and of the corresponding optical trap stiffness k are required before each measurement. In our experiment, we use beads of carboxylated melamine resin of diameter 3 μm (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) with a standard deviation of 0.2 μm . Beads are checked optically under microscope and the ones outside the deviation are rejected. This uncertainty on the probe size creates a relative error of 6.7%, on the viscoelastic moduli is much lower than the dispersion coming from the spatial heterogeneity of the mucus. The mean value of 3 μm given by the bead provider was then used. The bead chemistry must have an optical index (1.68 for the melamine resin) clearly different to the sample one to be well trapped. A high optical refractive index was preferred in order to reduce the laser intensity necessary to achieve a given trap stiffness. The mechanical strength (typical elastic modulus of melamine being between 4 and 9 GPa) and the thermal stability (up to 300 °C for the melamine) of the probe are also important parameters. Moreover, the probe chemistry or its coating have to minimize the adhesive effects to the sample to don't affect the viscoelastic measurements.

Characterization and quality of the optical trap. Absorption and scattering are expected to degrade the performance of optical trapping when entering in a non-homogeneous medium. The effects are however reduced in thin samples and if near infra-red lasers (here, 1064nm) are chosen so it is still possible to trap efficiently particles well within living tissues [1]. For a quantitative analysis, an optical trap is however modified when entering deeper into the medium and, one should carefully take into account two main effects leading to a change of the trap stiffness: the light intensity loss and the shape of the trap. We have systematically characterized in situ the trap stiffness from the local optical potential analysis for the less elastic samples (obtained from the Brownian motion of the bead inside the trap). The measurement of the trap stiffness by this method does not depend of the local rheological

properties of the medium. In our article we showed microrheology results on several kind of samples that have different concentrations in impurities. Inside the mucus sample from ALI cultures the impurities are mainly dead cells and cell debris (the mucus by itself is transparent) and for the “ex vivo” mucus there is also a limited amount of red and white blood cells. In the Figure S3 we show typical examples of impurities concentrations corresponding to each kind of sample. In FigS1A and FigS1B is shown the concentration inside mucus collected from ALI cultures with BEGM medium, in FigS1C the typical concentration of the mucus layer close to the tissue of ALI cultures with BEGM medium, and in FigS1D the typical concentration of the mucus from ALI cultures with Pneumacult medium and the “ex vivo” mucus. In order to evaluate more systematically the influence of the height and the presence of the cell and debris on the optical trap, we prepared water samples, pure and with cells and debris concentrations corresponding to the mucus from ALI cultures with BEGM medium (FigS1B and FigS1C). Thanks to the Brownian motion recorded and analysed on 10 min at low laser power (8 mW) we have finely characterized the evolution of the optical trap with the height. Results are shown in Figure S2 and Figure S3. Analysis of the trap at several heights through the water with increasing concentrations (FigS1B and FigS1C) of dead cells and debris show that the trap homogeneity is conserved and there is no major deformation of the optical trap, as shown in Figure S3. The laser trap remains axisymmetric as illustrated on the FigS3C. After crossing the whole sample (100 μ m thick), the image of the reflection of the laser beam on the glass slide (FigS3D) has still a circular shape even if tiny speckles are present. The change of trap stiffness with height over 100 μ m is very similar for the 3 concentrations: pure water (FigS2A), less than 1% in volume like the mucus collected from ALI cultures with BEGM medium (FigS2B), and less than 5% like the mucus layer close to the tissue of ALI cultures with BEGM medium (FigS2C). A typical decrease of 35% is observed through the sample. Even if we pass through a cell with the cell directly vertical under the laser trap, the loss of the trap stiffness k is also around 35% (FigS2D). One can conclude that the effect of the debris can be neglected in a first approximation.

Effect of the temperature. In our experiments a thermocouple, directly stuck on the coverslip, gives the global temperature of the sample. The local temperature of the bead is however unknown accurately and can be higher. Observations performed with the same beads on other dilute aqueous samples such as lyotropic liquid crystals or giant micelles give indirect indications of the temperature shift due to the laser intensity. At the most powerful intensities used here (~ 1 W), both the phase transitions of the liquid crystals and the very sensitive rheology measurements of giant micelles [2], indicate a limited heating below 10°C. This is in typical accordance with the rule of thumb that 1064nm laser in vivo give a typical increase of about 1 °C/100 mW [3]. We can assume that inside the mucus, a poorly absorber in the near infra-red, the local heating doesn't exceed this value. Moreover, as shown in Figure S4, the temperature doesn't change the mucus viscoelastic behaviour as a function of the frequency. The decrease of the viscoelastic values doesn't exceed 50% for a 7°C temperature increase. Macrorheology measurements of BEGM collected mucus sample, not shown here, also confirm a limited change of viscoelastic moduli (40 %) when the temperature is increased by 17°C. These variations remain within the variations in rheological response due to heterogeneities and in all cases are negligible compared to the high increase in elasticity observed when decreasing the distance probe/epithelium.

1.2 Effect of the bead dragging on the local mucus viscoelasticity.

Macrorheology experiments performed on collected BEGM mucus samples show that a stationary regime is reached in less than 30 seconds and that sample recovering (perfect overlapping of the curves) occurs within 5 min. In collected mucus samples, recovery is also observed in our microrheology

measurements. Successive measurements (after three minutes waiting) on the same bead at the same location give similar results, as illustrated in Fig S5A. We also tested the possible influence of a large perturbation before measurement. When a bead is tested locally, then moved at a large distance (typically 20 μ m) and replaced at its initial position (see a typical example in Figure S5B), some difference can be observed with a maximum change of 35% of the local viscoelasticity. This change is similar to the one due to the spatial heterogeneity. We thus neglected the effect of residual stresses or plasticity that could be induced by dragging on the microrheology response.

2 Distinction of several bead environments within the mucus (cases I and II)

For the “ex vivo” mucus, with a high concentration in impurities and aggregates inside, we chose to differentiate two cases, illustrated on the Figure S6: when the bead is close to aggregates and trapped by the strong network around them (corresponding to the case I of the Figure 4), illustrated on the FigS6B; and when the bead is away from aggregates and free of their influence (corresponding to the case II of the Figure 4), illustrated on the FigS6C. The criterion is not the distance to the aggregate, although it is informative, but the existence of a large restoring force (around 1nN with the maximum power of the laser) when the bead is moved away from the aggregate beyond a certain distance (typically 10-20 μ m). The FigS6A illustrates a particular case corresponding to a bead inside a cell aggregate. In this particular case the viscoelastic response is an elastic plateau (power law exponent equal to 0) around several Pa. Within the mucus from BEGM cultures (poorly concentrated in dead cells and debris), either collected or directly on the epithelium, we always did the measurements in a configuration corresponding to the case II. For the mucus from Pneumacult cultures (very concentrated in dead cells and debris), however, we did the measurements in both configurations and obtained similar results.

[1] Zhong, M.-C. *et al.* *Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers.* *Nat. Commun.* 4:1768 (2013).

[2] Berret, J. F., Porte, G., & Decruppe, J. P. (1997). *Inhomogeneous shear flows of wormlike micelles: a master dynamic phase diagram.* *Physical Review E*, 55(2), 1668.

[3] Liu, Y.; Cheng, D. K.; Sonek, G. J.; Berns, M. W.; Chapman, C. F.; Tromberg, B. J., *Evidence for Localized Cell Heating Induced by Infrared Optical Tweezers.* *Biophysical Journal* 1995, 68, (5), 2137–2144. & Gross, S. P. *Application of optical traps in vivo.* *Methods Enzymol.* 361, 162, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)61010-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)61010-4) (2003).

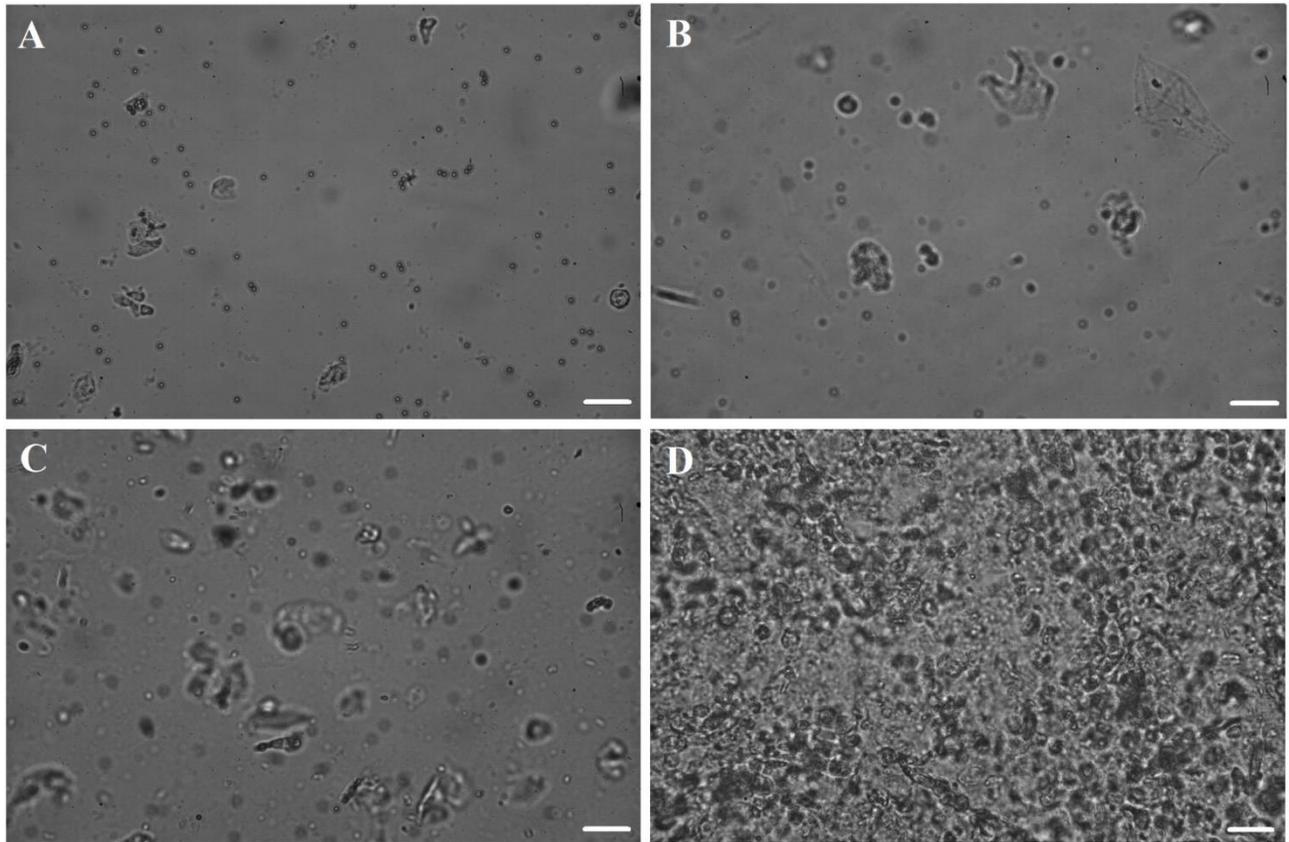


Figure S1. Image of the impurities concentration inside the samples. A) Mucus collected from BEGM cultures. We observe typically less than 1% in volume of cells and debris inside. B) Water with approximately the same concentration of cells and debris inside than the samples of mucus collected from BEGM cultures. C) Water with a concentration of cells and debris inside (less than 5% in volume) similar to the mucus layer close to the epithelium of BEGM cultures and also like the “ex vivo” mucus corresponding to the patients 5 and 7. D) Mucus collected from Pneumacult cultures. We observe a critical concentration of cells and debris inside ($> 10\%$). This example is representative of all the Pneumacult mucus samples, collected and on the epithelium, and also the “ex vivo” mucus at the exception of the patients 5 and 7. Scale bars: 30 μm .

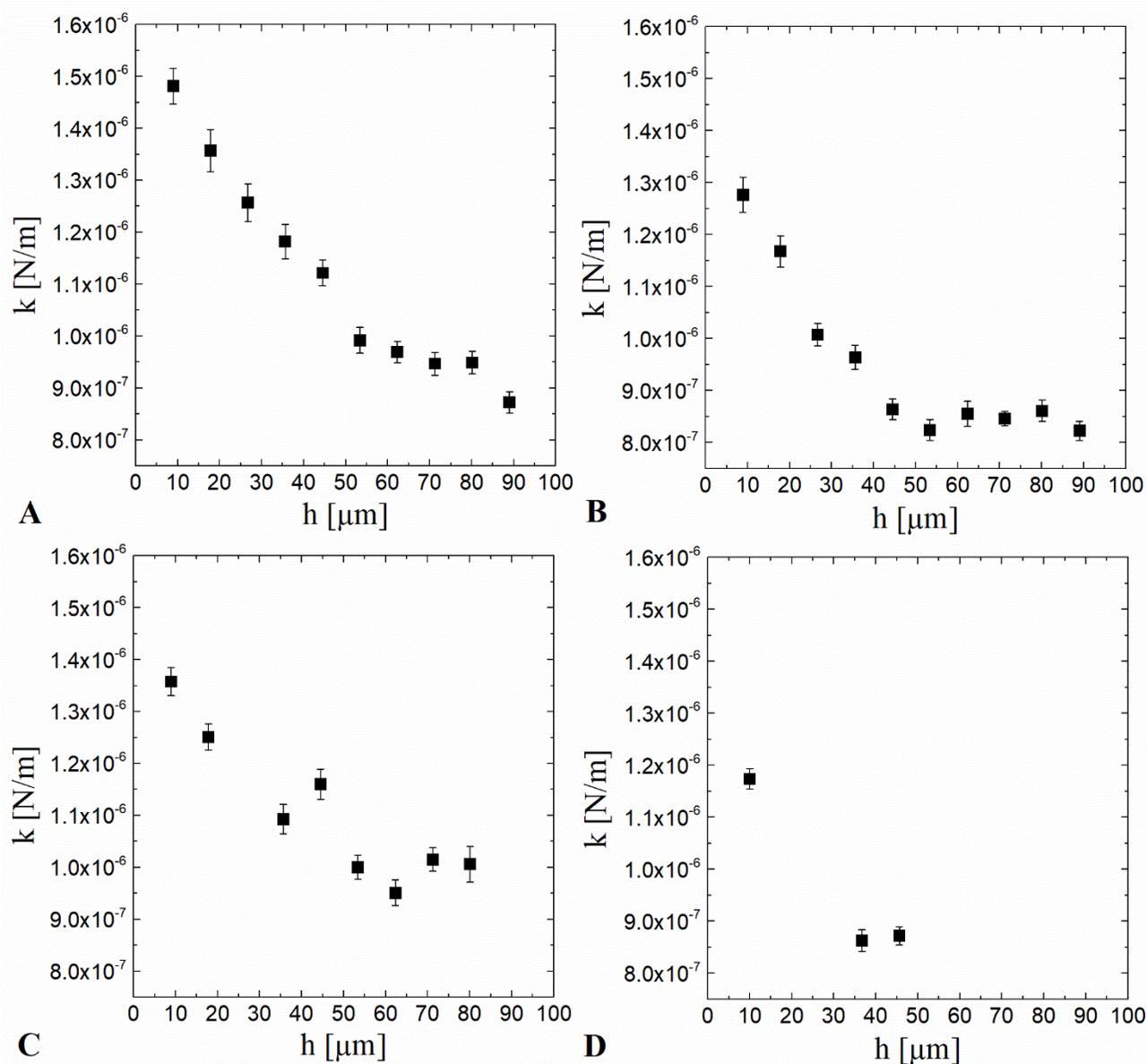


Figure S2. Optical trap stiffness as a function of the height in water with several concentrations of dead cells and debris inside. Measurements were done at a low laser power of 8 mW to determine the trap stiffness k from the analysis of the Brownian motion of a bead inside the trap. The laser power and the bead are the same for all the measurement in height. In A) measurements in pure water, without cells or debris, in B) with a concentration in dead cells and debris similar to the one found inside collected BEGM mucus (see illustration FigS1B) and in C) with a concentration similar to the one found inside the mucus layer close to the epithelium of BEGM cultures (see illustration FigS1C). The panel D) was also obtained with the water sample with dead cells and debris (<5%) similar to the one found inside collected BEGM mucus (FigS1B), but in the most unfavorable condition with a large debris occulting the bead. The first point, is taken near the cell (around 5 μm), at the same height $h=10\mu\text{m}$. The last two points are taken above the cell. In these four cases we observe the same global loss of trap stiffness k of 35%.

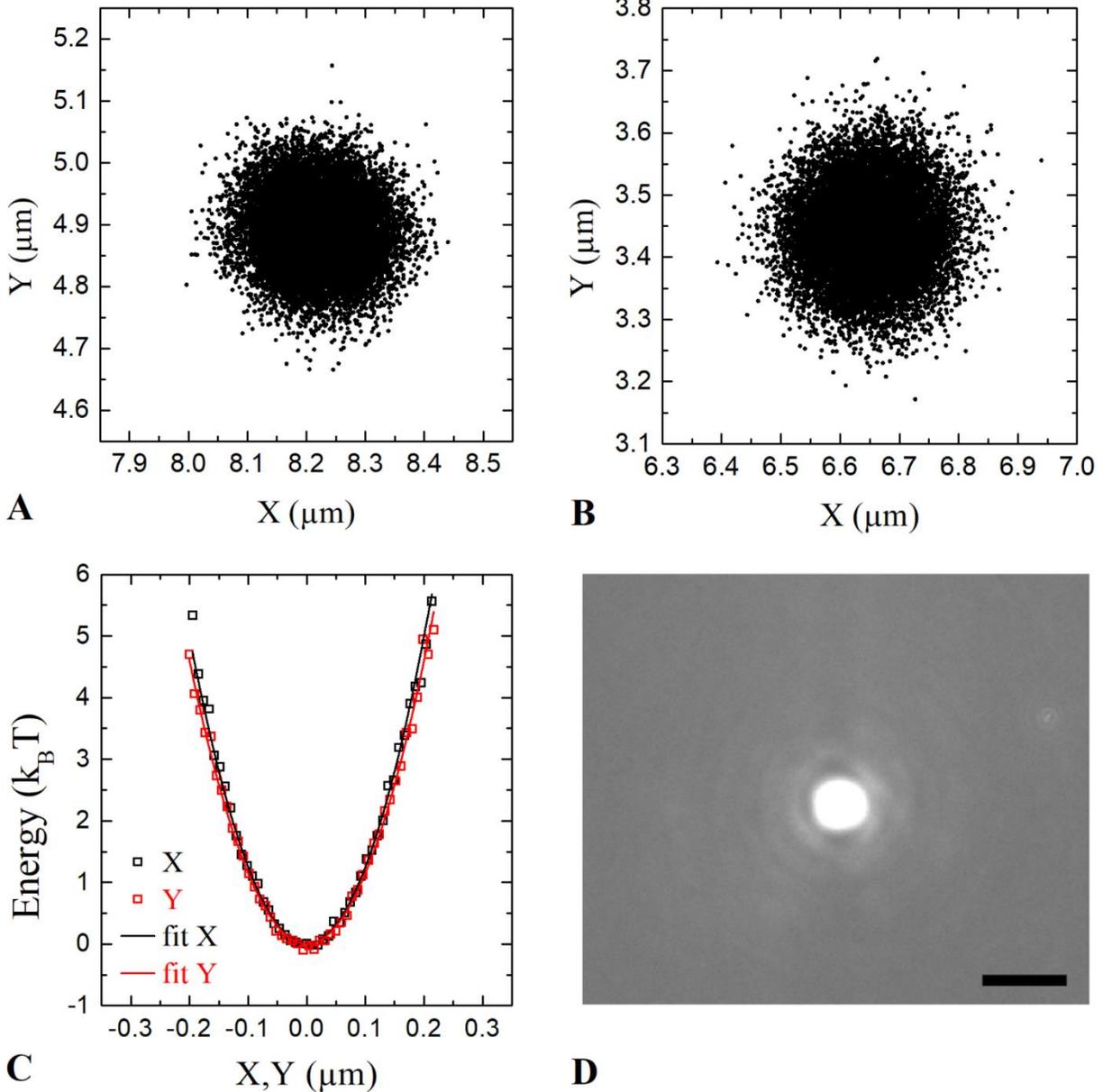


Figure S3. Characterization of the optical trap quality inside water with a concentration of dead cells and debris less than 5% similar to the one found close to the epithelium of BEGM cultures (see illustration FigS1C). The Brownian motion is recorded during 10 min at 30fps: in panel A) at a distance of 17.8 μm from the coverslip, and in panel B) at a distance of 71.2 μm from the coverslip. Panel C) shows the energy potential of the laser trap for the height 71.2 μm on the X (black squares) and Y (red squares) axis. The solid lines are the corresponding quadratic fits with $k_x=1.03\text{pN}/\mu\text{m}$ and $k_y=0.95\text{pN}/\mu\text{m}$. Panel D) shows the reflection of the laser beam on the slide after crossing the 100 μm of sample. Scale bar, 2.5 μm . The homogeneity of the Brownian motion is well conserved, there is not deformation of the laser trap focus nor additional ghost traps.

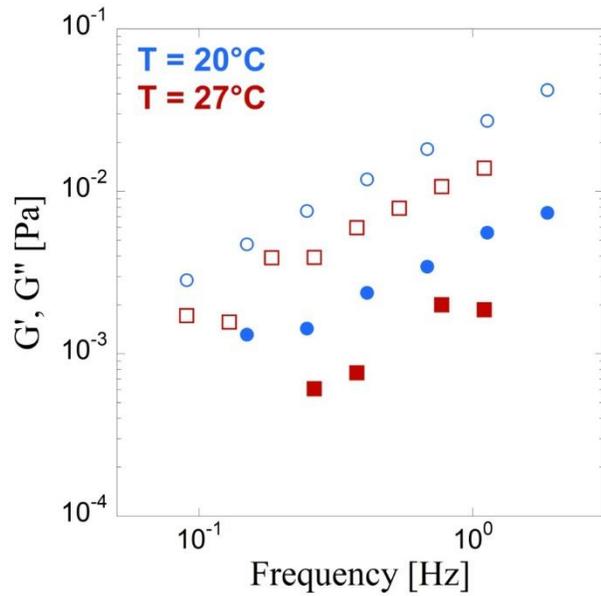


Figure S4. Elastic and viscous moduli G' and G'' (full and empty symbols) as a function of the frequency on a collected BEGM mucus for two temperature values T : $T=20^{\circ}\text{C}$ (blue circles) and $T=27^{\circ}\text{C}$ (red squares). We can see that an increase of the global temperature around 7°C decreases the viscoelastic values by 50% (relatively to the initial temperature of 20°C). This is in the range of the mucus heterogeneity observed for a same height on the BEGM cultures and lower than the difference measured in function of the height to the epithelium.

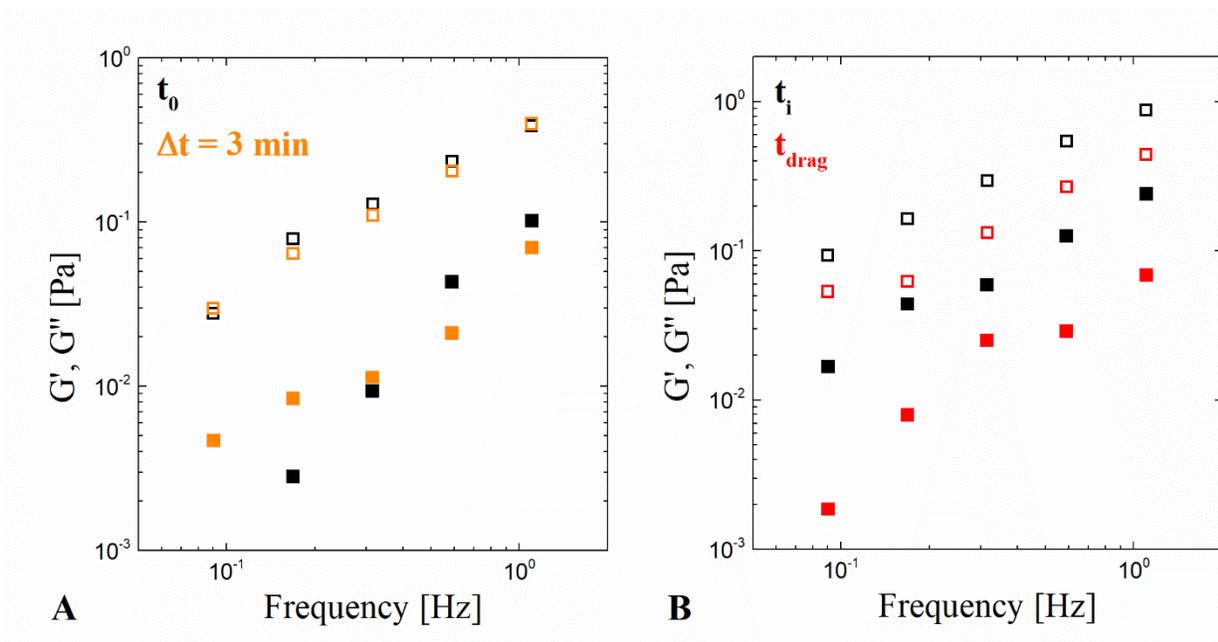


Figure S5. Microrheology of mucus collected from a “Pneumacult” bronchial epithelium culture. Viscoelastic moduli G' (full symbols) and G'' (empty symbols) are plotted as a function of the frequency. The panel A shows a microrheology measurement (black squares) followed by a second one (orange squares) done at the same location with the same bead and same laser power. We waited 3 min between the two measurements. We obtain an overlap of the 2 curves. The panel B show a measurement (black curve) taken with a bead already present at its location. After this first measurement we dragged the bead 20 μm to the top, then 20 μm to the bottom to its former position. We waited 3 min before taking the second measurement (red curve). The two curves do not overlap, the viscoelasticity after dragging is here 35% lower than initially.

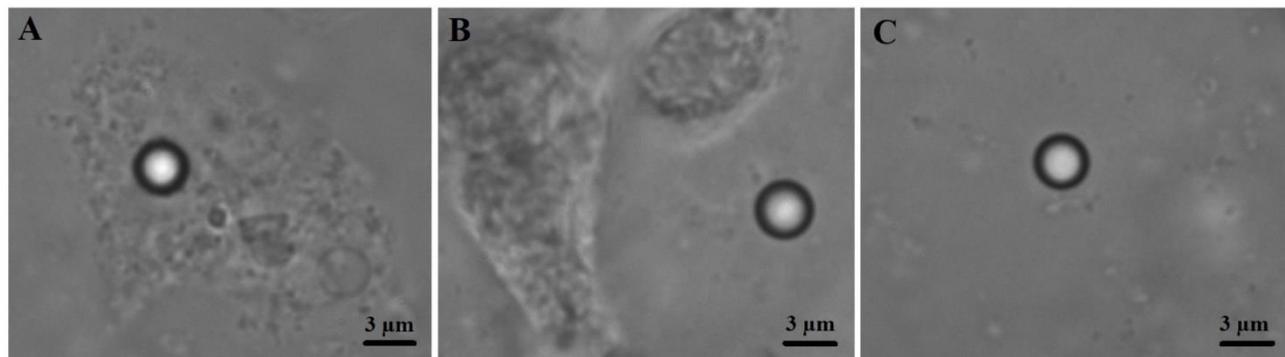


Figure S6. Images of the 3 types of bead locations considered for the mucus “ex vivo”. A) Case of a bead embedded in cells and debris. B) Case I of a bead close to a cells and debris aggregate. C) Case II of a bead far from aggregates and free of their influence.

I.4. Conclusions et Perspectives

Nous avons caractérisé en rhéologie le mucus issu du modèle ALI d'épithélium bronchique humain, à l'échelle macroscopique en cisaillement pur et à l'échelle microscopique en micro-rhéologie active. Ce projet a souligné le caractère hétérogène et complexe du mucus, avec un comportement élastique dominant à l'échelle macroscopique et un comportement visqueux dominant à l'échelle microscopique mais avec une forte adhésion et élasticité aux interfaces. Ces observations, couplées à une imagerie de la structure du mucus en cryo-microscopie électronique à balayage, appuient l'hypothèse de la structure du mucus composé de deux phases et réseaux imbriqués, l'un aux pores larges et aux parois élastiques, comme une toile d'araignée, et l'autre, une solution aqueuse faiblement viscoélastique et à petits pores peu élastiques qui remplit les pores du premier réseau. L'utilisation des pincettes optiques directement sur l'épithélium a également montré l'hétérogénéité et la variation de la viscoélasticité du mucus dans la couche. Une comparaison du comportement rhéologique du mucus issu de sujets sains à celui provenant de patients atteints de BPCO a aussi été menée. Bien que les différences observées soient dans l'ensemble non significatives, l'étude de la rhéologie du mucus pourrait être étendue à d'autres pathologies (asthme, mucoviscidose, ...), pour lesquelles des études menées sur des expectorations ont montrées des différences significatives. De plus, il n'est pas établi que les différences de comportements rhéologiques soient dues au réseau de mucines sécrétées par l'épithélium. Ces différences peuvent être induites par les leucocytes, les protéines, les bactéries ou encore l'ADN, présents en plus grande quantité dans le mucus de ces pathologies. L'exploration du régime non linéaire du mucus en macro-rhéologie, à large amplitude de déformation imposée, pourrait être étendue à plusieurs échantillons et pathologies pour déterminer si des différences significatives sont présentes dans ce régime.

L'échelle microscopique semble bien adaptée à l'étude de ce fluide complexe et hétérogène. Pour aller plus loin sur le comportement micro-rhéologique du mucus, l'étude en rhéologie non linéaire pourrait être reproduite à cette échelle. La micro-rhéologie active pourrait être comparée à celle passive, notamment à deux points, pour étudier les interactions à l'intérieur du mucus. Ces études peuvent être menées pour différentes compositions et concentrations du mucus, et avec plusieurs tailles de billes, afin d'explorer les propriétés du réseau.

Les mesures préliminaires de micro-adhésion mériteraient d'être poursuivies pour mieux comprendre les propriétés adhésives du mucus. De plus, en mettant en place une boucle de rétroaction il serait possible d'étudier les phénomènes de relaxation et de rupture de l'adhésion sous une tension constante. Ces mesures d'adhésion permettraient de compléter les études à l'échelle macroscopique présentes dans la littérature et d'analyser l'importance de la micro-adhésion sur l'efficacité du couplage mucociliaire. La micro-adhésion comme potentiel marqueur des pathologies pourrait être explorée afin de valider nos observations lors des prélèvements de mucus d'une capacité de filetage différente entre les échantillons.

PARTIE II : COORDINATION SPATIO-TEMPORELLE DU BATTEMENT CILIAIRE

Plan détaillé de la deuxième partie

II.1. Etat de l'Art	146
II.1.1. Biologie du battement ciliaire	146
II.1.1.1. Structure d'un cil motile et mécanismes du battement	146
II.1.1.2. Mécanismes de régulation.....	148
II.1.2. Couplage hydrodynamique entre cils et fluides.....	151
II.1.2.1. Battement d'un cil dans un fluide	151
II.1.2.2. Coordination entre plusieurs cils.....	156
II.1.2.2.1. Couplage	156
2.2.2. Battement collectif	161
II.1.2.3. Transport mucociliaire	164
II.1.2.3.1. Génération du transport	164
II.1.2.3.2. Impact des propriétés du fluide sur le transport.....	166
II.1.2.3.3. Rôle de l'hétérogénéité de l'activité ciliaire.....	170
II.1.3. Conclusion : complexité et modulation de la coordination ciliaire et du transport associé.....	173
II.2. Méthodes d'acquisition, de traitement et d'analyse des vidéos	175
II.2.1. Acquisition du battement ciliaire et du transport du fluide par vidéo-microscopie.....	175
II.2.1.1. Paramètres généraux d'acquisition	175
II.2.1.2. Acquisition de l'activité ciliaire	175
II.2.1.3. Acquisition du transport du mucus ou du fluide.....	176
II.2.1.4. Mode d'application des drogues et des fluides viscoélastiques	177
II.2.2. Article 3 : Traitements des vidéos et analyses des trajectoires de battement	179
II.2.2.1. Présentation de l'article 3	179
II.2.3. Calcul du champ de vitesse de transport.....	211
II.3. Caractérisation de l'activité ciliaire et du transport du mucus	213
II.3.1. Comparaison entre les cultures BEGM et PneumaCult et entre les trois groupes de patients	213
II.3.2. Quelques exemples sur l'effet de drogues spécifiques	215
II.3.2.1. Effet d'une inhibition de la régulation du calcium intra-cellulaire	215
II.3.2.2. Impact du tabac	218
II.3.3. Impact de la viscoélasticité du fluide.....	221

Partie II : Coordination spatio-temporelle du battement ciliaire

II.3.4. Evolution en fonction de la maturité de la culture	223
II.3.4.1. L'activité ciliaire et sa répartition spatiale au cours du temps	223
II.3.4.2. Efficacité du transport mucociliaire en fonction de la densité de battement	228
II.4. Coordination spatio-temporelle du battement ciliaire.....	231
II.4.1. Caractérisation du battement individuel des cils	231
II.4.1.1. Trajectoire spatiale des cils	231
II.4.1.2. Fluctuation de la période de battement des cils au cours du temps	232
II.4.2. Coordination intra cellules ciliées, types et évolution des mécanismes de battement	234
II.4.3. Coordination inter cellules ciliées.....	241
II.5. Conclusions et Perspectives	244

II.1. Etat de l'Art

II.1.1. Biologie du battement ciliaire

II.1.1.1. Structure d'un cil motile et mécanismes du battement

Les cils motiles ou flagelles sont composés d'un cytosquelette de microtubules, nommées axonèmes, et de plus de 250 protéines (Nicastro et al. 2006). Quatre zones peuvent être distinguées dans le cil : la zone basale ancrée dans la cellule ; la zone de transition à la surface de la cellule entre la base et le corps du cil ; le corps du cil ; et l'extrémité du cil (Fisch and Dupuis-Williams 2011; Croft et al. 2018) (Figure 37B).

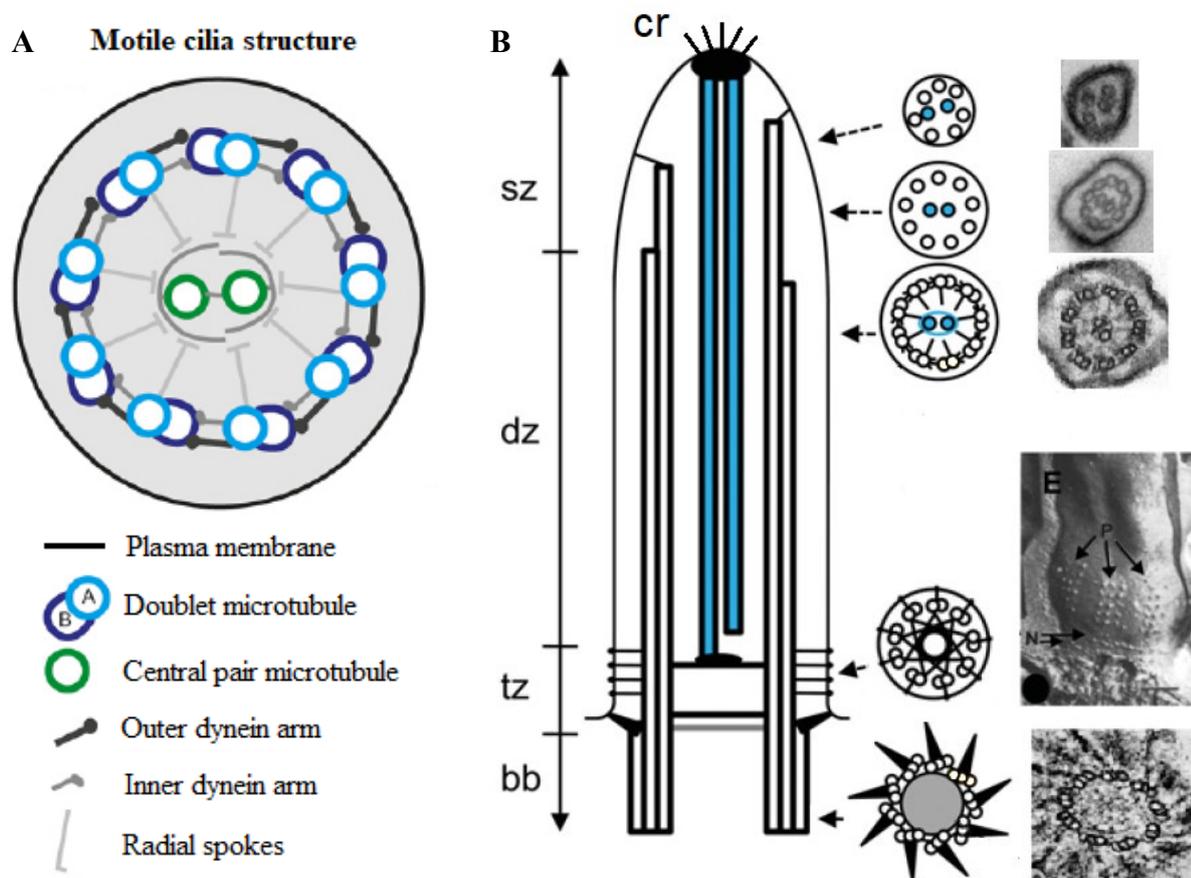


Figure 37 : Ultrastructure d'un cil motile ou d'un flagelle. A) Schéma de la structure interne du cil en coupe transversale. Image adaptée de Croft et al., 2018. B) Schéma en vue longitudinale de la structure d'un cil motile avec les différentes zones qui le composent, de bas en haut : le corps basal « bb », la zone de transition « tz », la zone centrale « dz » avec les doublets de microtubules (structure 9+2 axomènes), et la zone terminale « sz » avec la terminaison des microtubules. « cr » réfère aux « antennes », nommées 'ciliary crown', sur la tête du cil. A droite du schéma longitudinal du cil, des coupes transversales (schéma + image obtenue en microscopie électronique à transmission) illustrent la structure interne de chaque zone. L'ensemble du panneau B) est issu et adapté de Fisch et Dupuis-Williams, 2011.

Le corps du cil. Il y a neuf doublet de microtubule qui forme un cercle autour d'un doublet central, d'où la structure dite 9+2 axomènes (Croft et al. 2018; Satir 1968; Nicastro et al. 2006; Porter and

Sale 2000) (Figure 37A). Pour permettre la motilité, les neuf doublets en périphérie sont munis de moteurs moléculaires, composés de protéines de type kinésine II, nommées dynéines. Chaque doublet périphérique comporte un bras de dynéine interne et un externe, afin de rendre le cil flexible (Sartori et al. 2016). Le déplacement de l'extrémité des bras le long des structures de microtubule, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, engendre une traction, de l'ordre de 1 pN par bras de dynéine (Shingyoji et al. 1998), et donc une courbure des microtubules (Lindemann 2007; Lindemann and Lesich 2010). Le déplacement coordonné de ces bras de dynéine, le long de la structure du cil et entre la face interne et externe des doublets, permet de mouvoir le cil avec la génération d'une onde de flexion. La force totale exercée par le cil est de l'ordre de 0,1 à 1 nN (Teff, Priel, and Gheber 2007; Teff, Priel, and Gheber 2008). Des défauts dans la structure du cil, que ce soit dans la construction des microtubules ou dans les bras de dynéines permettant la motilité, entraînent donc une absence de motilité du cil ou un cycle de battement anormal et inefficace. Par exemple, une absence de dynéines internes et externes ou juste externes cause une immobilité totale alors qu'une absence de dynéines internes seulement engendre une perte de la flexibilité du cil, qui bat en restant raide et avec une faible amplitude (Chilvers, Rutman, and O'Callaghan 2003). Ces défauts ne sont pas spécifiques à des patients atteints de dyskinésie ciliaire primitive, bien que dans ce cas la quasi-totalité des cils présents sont touchés, entraînant la perte du transport mucociliaire (Papon et al. 2012). Ces anomalies sont présentes même chez des patients sains, bien qu'une faible proportion (<25% des cils) (Kempeneers, Seaton, and Chilvers 2017; Papon et al. 2012), et peuvent augmenter significativement dans le cas de pathologie respiratoire, comme dans l'asthme (Thomas et al. 2010).

La base du cil. La zone basale ancrée dans la cellule est composée de neuf triplets de microtubules, nommés A, B et C (Figure 37B). Au niveau de la base des cils, un réseau de cytosquelette composé de filaments intermédiaires et de microtubule maintient la base des cils et les relie entre elles dans le tissu (Figure 38) (Tateishi et al. 2017). Ce cytosquelette ancre le cil dans la cellule et lui évite de s'en arracher malgré sa motilité mais peut également jouer un rôle de synchronisation du battement au sein de la cellule grâce à ce réseau élastique connecté (Wan and Goldstein 2016).

La zone de transition. La zone de transition fait la jonction entre la zone basale du cil à 9 triplets de microtubules (A, B et C) et le corps du cil à 9+2 doublets de microtubules (A et B). Ainsi, les neuf triplets externes perdent un microtubule, le C, pour devenir des doublets, et le doublet central est créé. C'est une zone complexe, comportant un plan terminal en bas et un plan basal en haut où s'ancre la paire centrale de microtubule, et des fibres reliant les microtubules à la membrane plasmique et au début de la paire centrale. Ces fibres permettent de rattacher la base du cil à la membrane plasmique, mais jouent également un rôle de transmission avec des protéines spécifiques, ce qui fait de la zone de transition une zone importante dans la communication, le transport et régulation intra-ciliaire (Fisch and Dupuis-Williams 2011).

L'extrémité du cil. L'extrémité du cil regroupe la terminaison des doublets de microtubules, avec dans l'ordre la fin du microtubule B, puis du A, et au bout du cil celle de la paire centrale avec la tête du cil à son extrémité. Cette zone peut être plus ou moins longue sur les cils et flagelles en fonction

de l'espèce, l'organe et la fonction, avec une longueur différenciée ou non entre les deux microtubules A et B des doublets externes et celle du doublet central (Fisch and Dupuis-Williams 2011; Croft et al. 2018; Satir 1968). La tête du cil peut être équipée de filaments nommés 'ciliary crown' (Fisch and Dupuis-Williams 2011) (Figure 37B). Ces filaments, présents sur les cils motiles de l'épithélium respiratoire, servent d'antennes aux signaux optiques, chimiques, osmotiques et mécaniques (Croft et al. 2018; Shah et al. 2009). La tête du cil a donc un rôle majeur dans la régulation intra cellulaire, mais aussi dans la communication inter cellulaire (Fisch and Dupuis-Williams 2011; Croft et al. 2018). Les antennes des cils de l'épithélium des voies respiratoires ont également des récepteurs spécifiques aux glycoprotéines, ce qui laisse supposer que le bout du cil peut adhérer à la couche de mucus pour aider à sa propulsion (Fisch and Dupuis-Williams 2011). Plus de 20 protéines différentes, spécifiques de l'extrémité du cil et qui interviennent dans ses fonctions de régulation et signalisation, sont ainsi recensées (Croft et al. 2018).

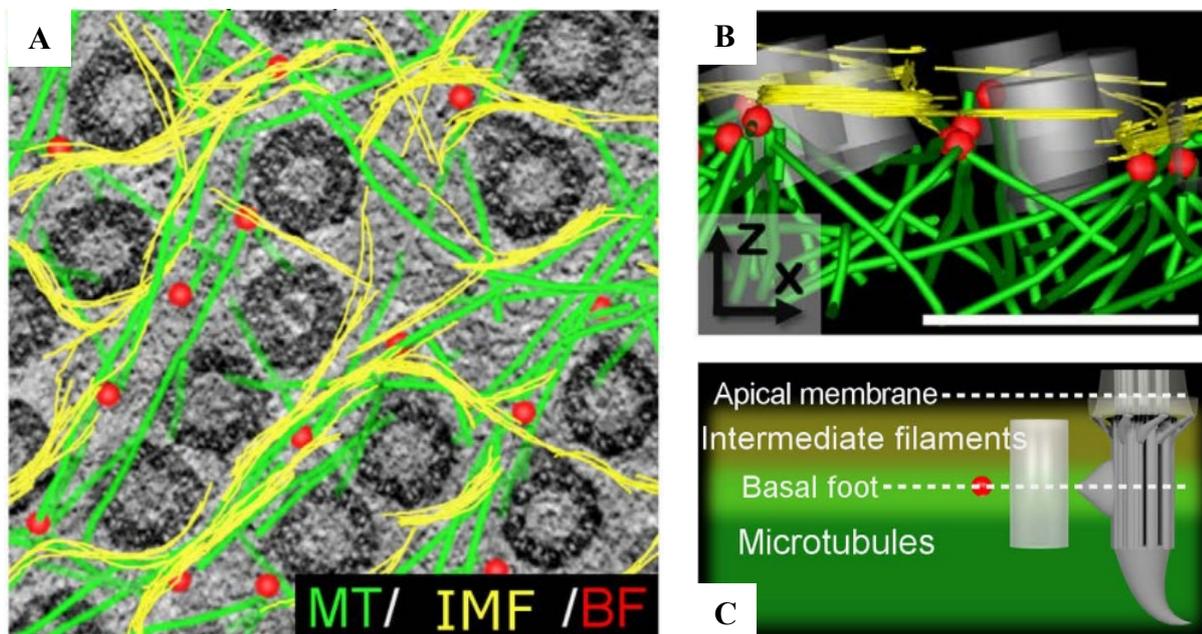


Figure 38 : Réseau de cytosquelette sous la surface des cellules ciliées entre la base des cils. A) Image en coupe transversale d'une cellule ciliée de la trachée de souris en microscopie électronique à transmission (TEM) et en fluorescence et microscopie électronique à très haut voltage (UHVMET). En vert les structures de microtubules (« MT ») avec leurs points de jonctions que sont les pieds basaux en rouge (« BF ») et en jaune les filaments intermédiaires (« IMF »). B) et C) Schémas en vue de profil de la structure du réseau de cytosquelette. Les images sont issues de l'article de Tateishi et al., 2017.

II.1.1.2. Mécanismes de régulation

Le cil ou la flagelle sont des objets biologiques et leurs mouvements, que ce soit en termes de flexibilité et forme du battement mais aussi de phase, d'amplitude et de fréquence du cycle, peuvent évoluer (Figure 39) afin de s'adapter à leur environnement (Ma et al. 2014; D. Eshel, Grossman, and

Priel 1985; Sartori et al. 2016; L. Liu et al. 2014). Pour cela, les cils possèdent des capacités sensorielles, principalement localisées à l'extrémité du cil, afin de sonder l'environnement extérieur. Des capacités de transport intra-ciliaire et de communication inter-cellules, qui vont être succinctement développé ci-dessous, permettent de réguler en continue le battement du cil en fonction des signaux perçus.

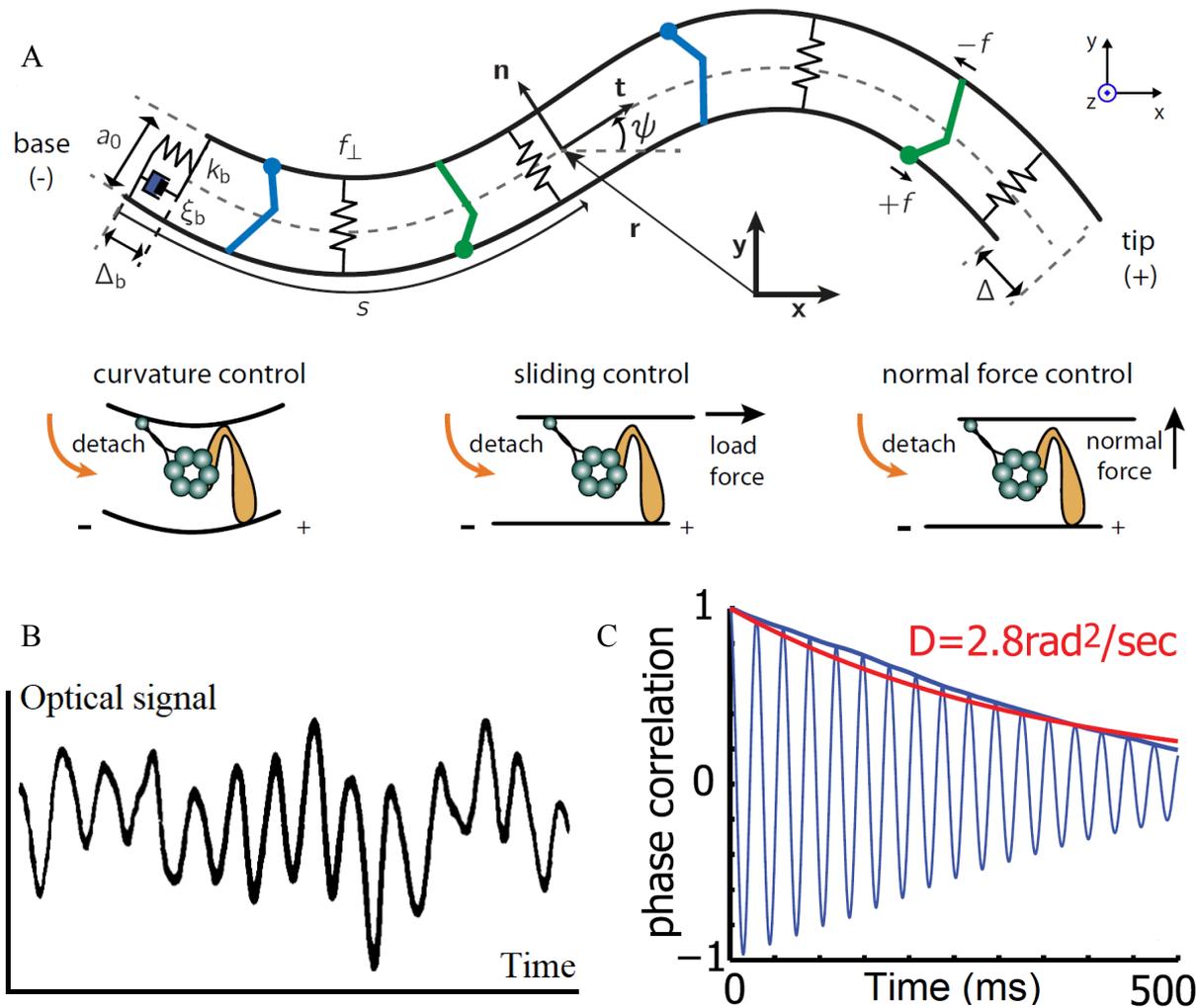


Figure 39 : Evolution de la forme et du signal du battement ciliaire. A) Schéma de la régulation intra-ciliaire de la courbure et de la forme du flagelle, ou du cil, par la contraction des bras de dynéines (segments bleus et verts). Schéma d'après Sartori et al., 2016. B) Fluctuations du signal optique d'un cil, notamment de son amplitude et sa fréquence de battement. Figure d'après Eshel, Grossman and Priel, 1985. C) Evolution de la phase φ de battement d'un flagelle. La fonction de corrélation de phase $C(t) = \exp\{i[\varphi(t_0+t) - \varphi(t_0)]\}$ est représentée au cours du temps et le coefficient de diffusion de phase D est exprimé par la courbe rouge. Figure d'après Ma et al., 2014.

Le transport intra-ciliaire (IFT en anglais) est réalisé grâce à des chargements de signaux et molécules le long des structures de microtubule par des protéines motrices de l'extrémité du cil à la zone de transition et la base du cil (Chien et al. 2017; Ou et al. 2005). La communication inter-cellules se fait notamment par l'intermédiaire de vésicules, relâchés par les cils et microvilli à partir de leur membrane plasmique, pouvant voyager de cil à cil ou directement vers la membrane d'une autre

cellule (Wood and Rosenbaum 2015; J. Wang and Barr 2018). En plus des paramètres de battement, ces mécanismes permettent également de réguler la longueur des cils ou flagelles lors de leur croissance (Uddin et al. 2019; Marshall and Rosenbaum 2001) et le nombre de cil par cellule dans le cas des cellules multi-ciliées, qui est ajusté en fonction de la surface de la cellule sur l'épithélium (Nanjundappa et al. 2019).

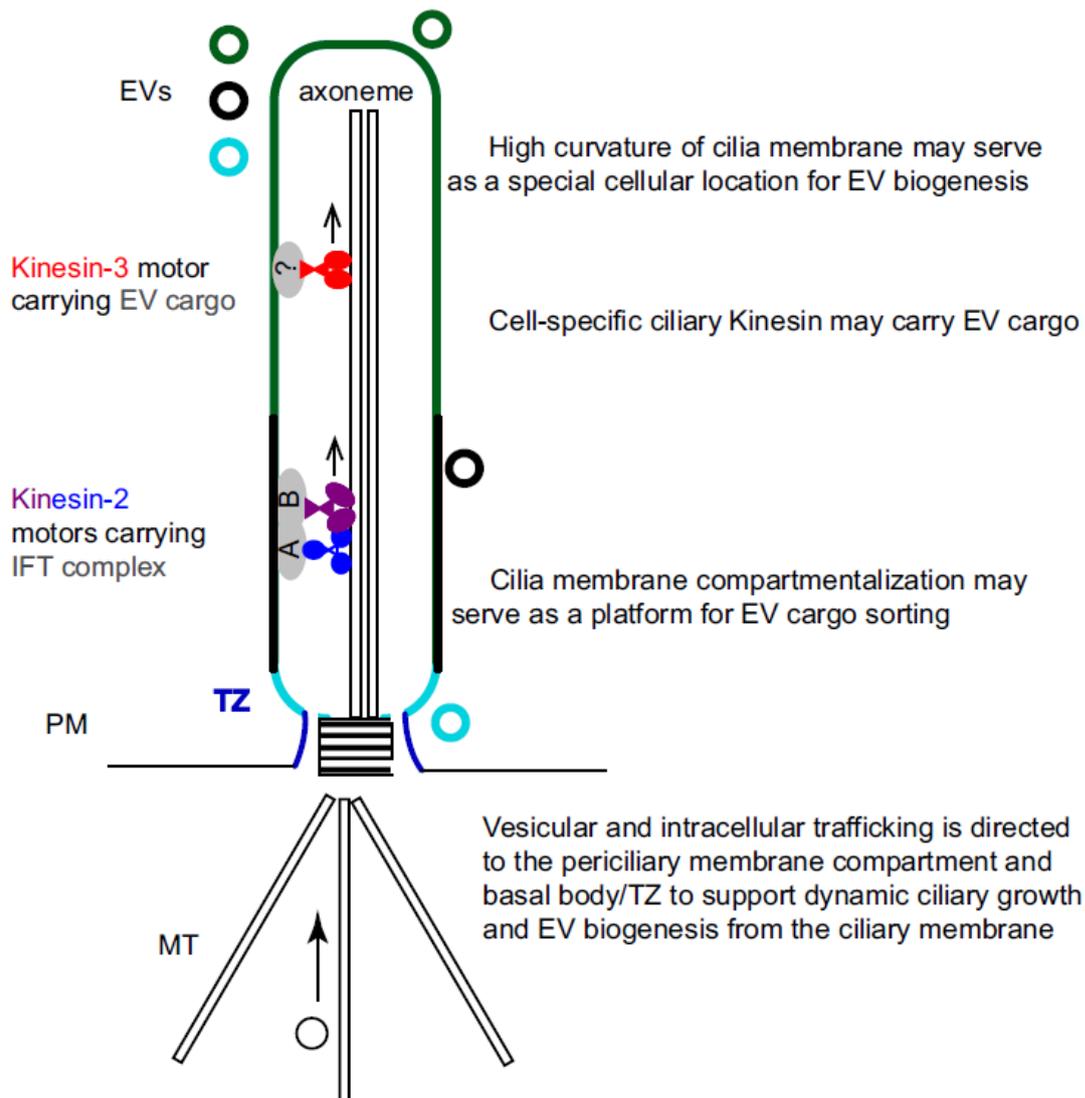


Figure 40 : Schéma des mécanismes de transport intra-ciliaire (IFT) et communication intercellulaire par l'émission de vésicules (EV). « TZ » : zone de transition du cil (cf Figure 37), « PM » : membrane plasmique du cil et « MT » : microtubules. Figure d'après Wang et Barr, 2018.

Cette régulation et adaptation du battement du cil à son environnement est particulièrement visible sur sa fréquence (Figure 41), avec une forte dépendance à la viscosité extérieure (Humphries 2013; L. Liu et al. 2014) et l'épaisseur de la couche péri-ciliaire (L. Liu et al. 2014) mais aussi la température (Humphries 2013; D. Eshel, Grossman, and Priel 1985), le pH (Clary-Meinesz et al. 1998) et l'intensité lumineuse (Drescher, Goldstein, and Tuval 2010). Elle s'opère notamment par la régulation de la concentration en calcium intracellulaire (L. Liu et al. 2014).

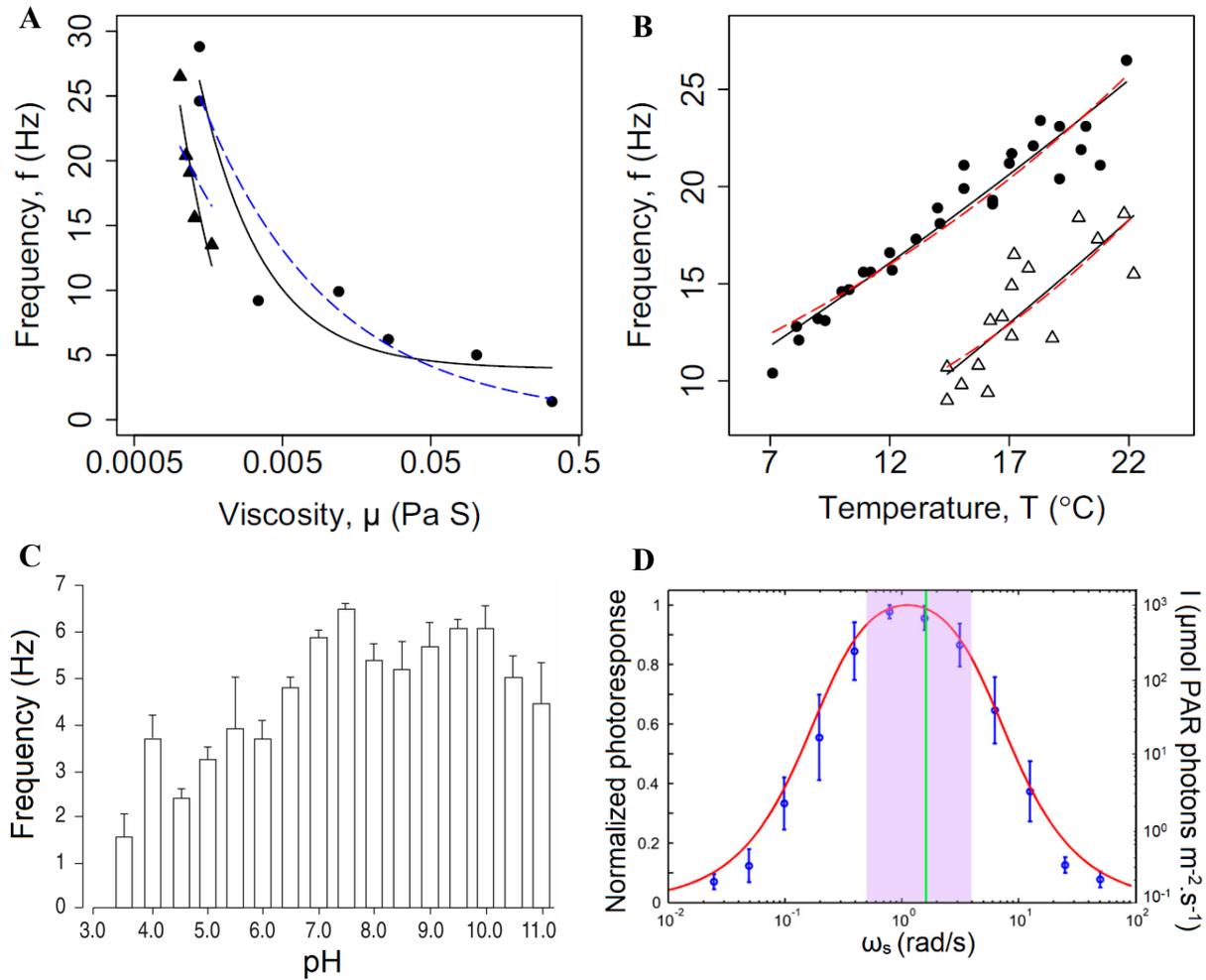


Figure 41 : Evolution de la fréquence du battement ciliaire en fonction des propriétés de son environnement. A) et B) Variation de la fréquence de battement des cils du bivalve *Mytilus Eludis* en fonction A) de la viscosité et B) de la température du milieu. Les lignes solides et pointillées représentent des modèles. Figures d'après Humphries, 2013. C) Fréquence de battement des cellules ciliées bronchique humaine (prélèvements de poumons) en fonction du pH après 5 min d'incubation (ajout de HCl ou de NaOH à du milieu nutritif). Figure d'après Clary-Meinesz et al., 1998. D) Fréquence de battement ω_s de la paire de flagelle de l'algue coloniale *Volvox Carteri* en fonction de l'intensité lumineuse I . La ligne rouge représente un modèle. Figure d'après Drescher, Goldstein and Tuval, 2010.

II.1.2. Couplage hydrodynamique entre cils et fluides

II.1.2.1. Battement d'un cil dans un fluide

Le mouvement et la force produites par le cil ou le flagelle par son battement, engendre un déplacement du fluide environnant. En raison de leurs faibles dimensions, les cils et flagelles engendrent un déplacement du fluide caractérisé par un faible nombre de Reynolds, $Re = \rho VL/\eta < 1$, avec ρ la masse volumique du fluide et η sa viscosité, V la vitesse de déplacement de l'objet (cil/flagelle) et L la dimension caractéristique du système. Cela signifie que les effets inertiels sont

négligeables par rapport aux forces visqueuses. Le régime d'écoulement d'un fluide incompressible peut donc être décrit par les équations de Stokes avec un champ de vitesse autour du cil ou flagelle qui décroît avec la distance r au cil et la viscosité η du fluide (en $1/r\eta$) (Lauga and Powers 2009; J. Elgeti, Winkler, and Gompper 2015). La modélisation d'un oscillateur dans ce régime d'écoulement prévoit un cycle asymétrique, avec une vitesse de déplacement non constante sur le cycle, qui dépend de l'interaction entre la force de cisaillement appliquée par l'oscillateur et la force visqueuse du fluide (Lagomarsino, Jona, and Bassetti 2003). Dans le cas d'un cil, caractérisé par une morphologie tubulaire flexible avec une extrémité fixe (base du cil) et l'autre libre (tête du cil), la forme du battement dans le fluide dépend également de la longueur du cil et de sa résistance élastique à la courbure (Mitran 2007; Gueron et al. 1997). Il en résulte un battement typique marqué par une phase de poussée, dite 'Stroke' en anglais, avec une vitesse de déplacement plus rapide, une force appliquée par le cil plus importante et une courbure minimale du cil, et une phase de recouvrement, dite 'Recovery-Stroke', avec un repliement du cil, une vitesse de déplacement et une force appliquée plus faibles (Figure 42, Figure 43). Ce cycle du cil ou du flagelle, avec la variation de sa courbure, de sa vitesse de déplacement, de sa force appliquée et du champs de transport engendré dans le fluide au cours du cycle, ont pu être observées et caractérisées expérimentalement sur des micro-organismes (Qin et al. 2015; Wan and Goldstein 2016; Brumley et al. 2014) et des épithéliums ciliées (Papon et al. 2012; L. Liu et al. 2013). Une observation détaillée du cycle du cil permet également de définir une phase de pause entre la phase de poussée et celle de recouvrement, et un rapport de vitesse de déplacement entre la phase 'stroke' V_s et 'recovery' V_r d'environ 0,6 (Papon et al. 2012).

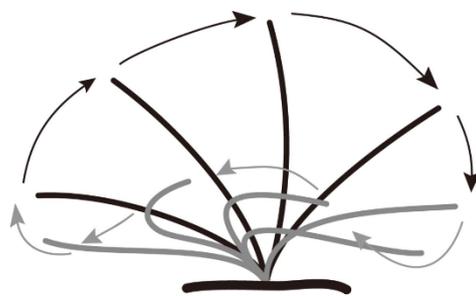


Figure 42 : Cycle de battement asymétrique d'un cil ou flagelle dans un fluide à faible nombre de Reynolds. En noir la phase de poussée ('stroke'), avec une vitesse de déplacement plus rapide, et en gris la phase de recouvrement ('recovery-stroke'), avec une vitesse de déplacement plus faible. Image mise à disposition par l'ERS journal (<https://erj.ersjournals.com/content/erj/44/6/1579/F2.large.jpg>).

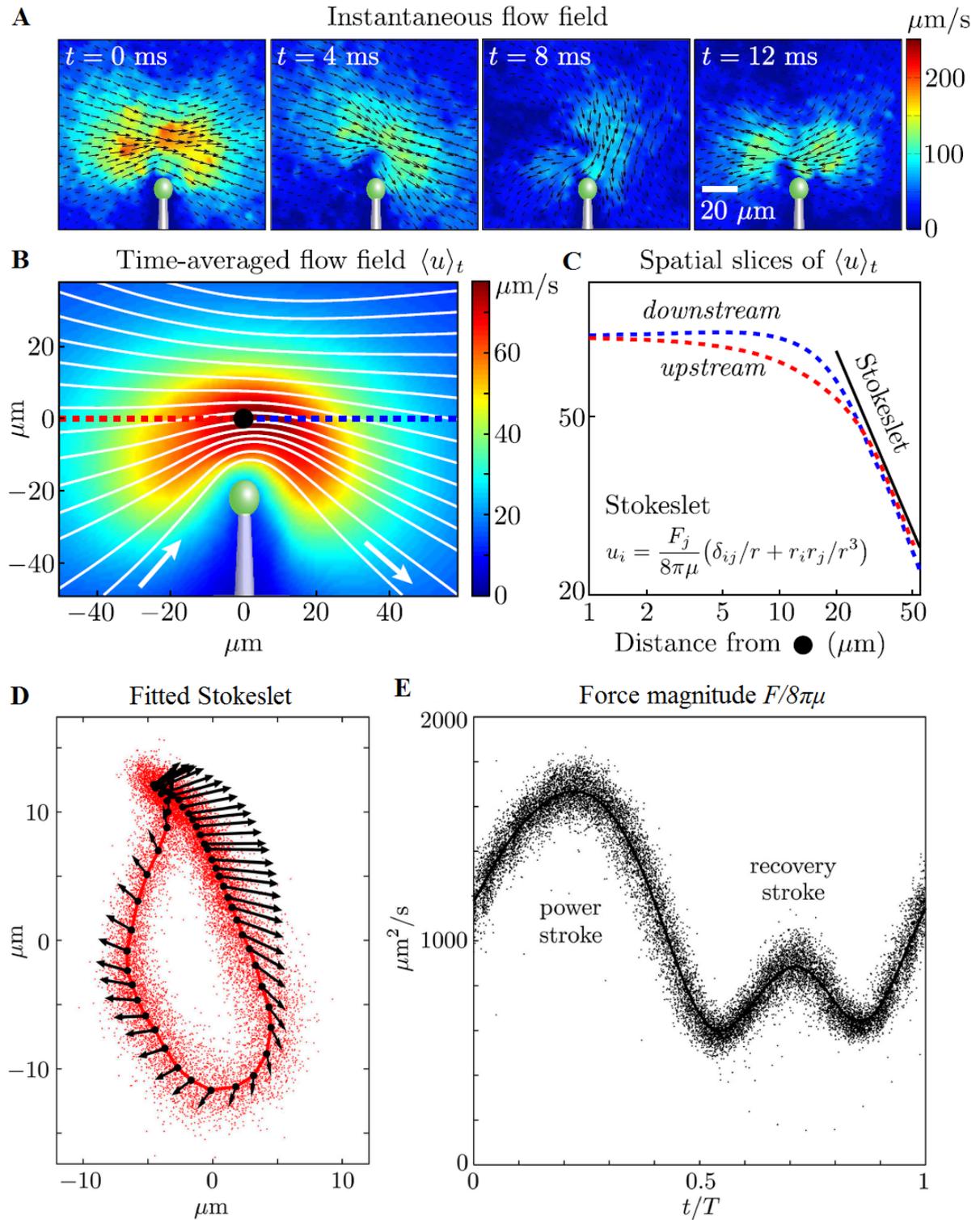


Figure 43 : Cycle d'un flagelle dans un fluide. A) Champ de vitesse u du fluide autour du flagelle de *Volvox carteri* à différents instants de son cycle. B) Champ de vitesse du fluide moyenné sur un cycle $\langle u \rangle_t$. C) $\langle u \rangle_t$ le long du profil horizontal passant par le bout du flagelle en fonction de la distance à l'axe central du flagelle (voir panneau B). D) Trajectoire spatiale vue de dessus du flagelle (point rouge) et son fit de Stokeslet (ligne rouge) avec le vecteur de la force appliquée à chaque instant. E) Amplitude de la force appliquée F du flagelle, normalisée par $8\pi\mu$ avec μ la viscosité du fluide, au cours du temps, normalisé sur période de battement T . Figure d'après Brumley et al. 2014.

La forme du cycle de battement résulte de l'interaction entre la force qu'exerce le cil et les propriétés du fluide (viscosité η , élasticité, temps de relaxation τ , ...), et dépend également de la morphologie, flexibilité et élasticité du cil (Brumley et al. 2014).

Flexibilité du cil. La perte de la flexibilité du cil due à des défauts structuraux, comme dans le cas de la dyskésie ciliaire, entraîne une diminution de l'amplitude battement et de l'asymétrie du cycle, avec un écart de vitesse de déplacement plus réduit entre la phase 'stroke' et 'recovery' (Papon et al. 2012; Chilvers, Rutman, and O'Callaghan 2003; Kempeneers, Seaton, and Chilvers 2017).

Propriétés du fluide. Plusieurs études théoriques (B. Liu, Powers, and Breuer 2011; Espinosa-Garcia, Lauga, and Zenit 2013; Gueron et al. 1997; Sabater 2017) et expérimentales (Qin et al. 2015; Sabater 2017) ont également montré l'impact du type de fluide, c'est à dire newtonien ou viscoélastique, et de sa viscosité, sur la courbure du flagelle, sa fréquence de battement ω , sa vitesse et l'efficacité de sa propulsion. Les études par simulation numérique et celles expérimentales (E. coli, alga *Chlamydomonas*) arrivent aux mêmes résultats. Une augmentation de la courbure du flagelle dans un milieu viscoélastique est observée comparée au milieu newtonien de viscosité similaire (Figure 44A). La vitesse de déplacement du micro-organisme augmente dans un fluide viscoélastique (Figure 44B et C) et elle se maintient plus longtemps dans le temps (visible sur la Figure 44B avec les flèches qui marquent les ruptures de vitesse plus espacées dans le fluide viscoélastique). Un pic d'efficacité de la vitesse de transport est atteint pour un nombre de Deborah ($De = \omega\tau$, qui définit le rapport de temps entre la relaxation du fluide τ et sa sollicitation par l'expérience, ici ω la fréquence de battement du flagelle) autour de 1 (Figure 44C). La variation de la viscosité des fluides a également un effet différent selon le fluide, newtonien ou viscoélastique. Sur une gamme de viscosité de 1 à 10 mPa.s, une diminution en loi de puissance de la fréquence de battement avec la viscosité est observée pour un fluide newtonien, théoriquement (Gueron et al. 1997) et expérimentalement (Qin et al. 2015). Pour un fluide viscoélastique, une légère diminution de la fréquence de battement est observée jusqu'à 2,5 mPa.s devant un plateau (Figure 45A). Entre 1 et 1000 mPa.s, la vitesse de déplacement chute à forte viscosité, mais plus rapidement pour un fluide viscoélastique, que pour un fluide newtonien (Figure 45B). La vitesse de déplacement normalisée par la vitesse de l'onde de flexion du flagelle augmente de façon continue pour le fluide newtonien sur la gamme de viscosité explorée alors que pour le fluide viscoélastique un maximum est atteint autour de 40 mPa.s avant un décroissance (Figure 45C). Une étude par simulation numérique de Smith et al. (Smith, Gaffney, and Blake 2009), souligne qu'en plus de la viscosité, le temps de relaxation du fluide τ ou le nombre de Deborah De est important dans le cas de fluides viscoélastiques, avec un taux de transport qui diminue avec l'augmentation du temps de relaxation.

Les propriétés du fluide sont donc fondamentales pour le couplage du cil ou du flagelle et donc pour l'efficacité de la propulsion engendrée. Cela concerne aussi bien la vitesse de transport du fluide par un épithélium que la vitesse de pénétration d'un micro-organisme dans ce fluide. Le mucus a donc un rôle majeur dans les épithéliums ciliés sur l'efficacité de la fonction mucociliaire. Ses

propriétés peuvent augmenter ou diminuer sa vitesse d'évacuation mais aussi favoriser ou entraver la pénétration des micro-organismes munis de flagelles comme les bactéries.

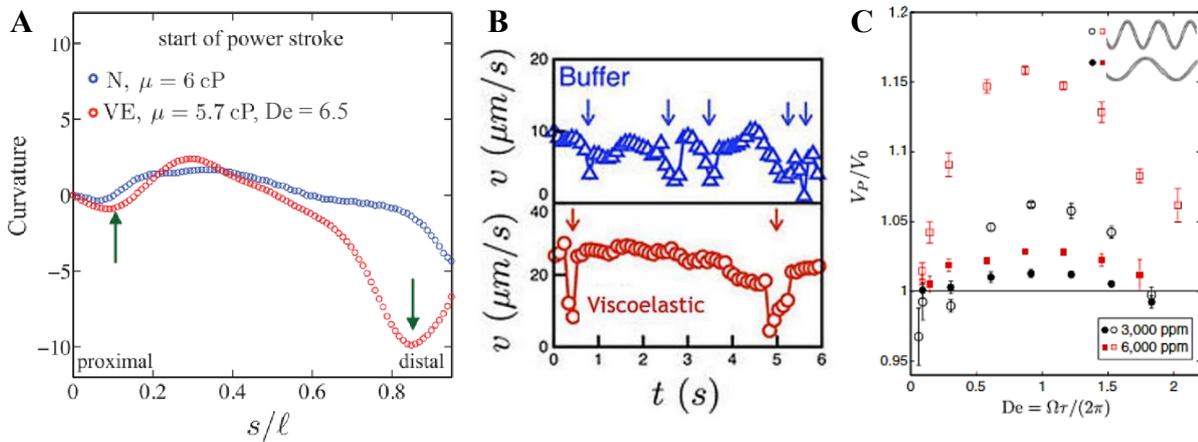


Figure 44 : Impact du type de fluide, Newtonien ou viscoélastique, sur la forme du battement d'un flagelle et l'efficacité de sa propulsion. A) Evolution de la courbure d'un flagelle (alga *Chlamydomonas*) au début de sa phase 'stroke' en fonction de la longueur de l'arc définie par le rapport entre la coordonnée curvilinéaire s et la longueur l du flagelle, pour un fluide newtonien (bleu) ou viscoélastique (rouge) de viscosité μ . D'après Qin et al. 2015. B) Evolution de la vitesse de déplacement v de la bactérie *E. coli* au cours du temps t dans un fluide newtonien (bleu) et viscoélastique (rouge). D'après Sabater 2017. C) Modélisation d'un flagelle au battement hélicoïdal et mesure du rapport de la vitesse de propulsion dans un fluide viscoélastique V_p sur celle dans un fluide newtonien V_0 , en fonction du nombre de Deborah $De = \Omega\tau / (2\pi)$, avec Ω la fréquence angulaire du flagelle et τ le temps de relaxation du fluide. Deux longueurs d'onde de la courbure du flagelle sont testées (symbole vides et pleins) et pour deux fluides viscoélastiques différents (carrés et ronds). D'après Liu, Powers and Breuer 2011.

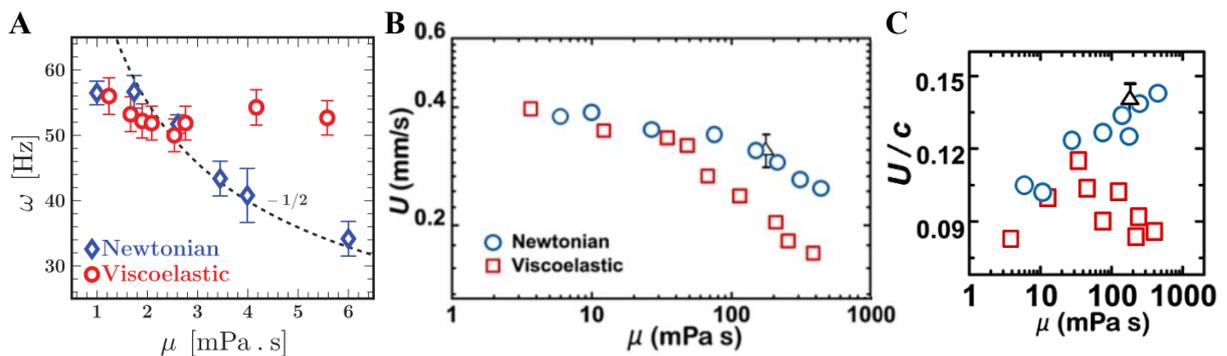


Figure 45 : Evolution de la fréquence de battement et de la vitesse de propulsion d'un flagelle en fonction de la viscosité pour un fluide newtonien (bleu) et un fluide viscoélastique (rouge). A) Fréquence de battement ω du flagelle en fonction de la viscosité μ du fluide. D'après Qin et al. 2015. B) Vitesse de déplacement U de la bactérie *E. coli* grâce à la propulsion par son flagelle et C) Efficacité de la vitesse de déplacement U/c , avec c la vitesse de l'onde de flexion du flagelle, en fonction de la viscosité μ du fluide et du type de fluide newtonien (bleu) ou viscoélastique (rouge). D'après Sabater 2017.

II.1.2.2. Coordination entre plusieurs cils

II.1.2.2.1. Couplage

L'un des principaux mécanismes avancé pour expliquer la synchronisation de deux oscillateurs libres dans un fluide incompressible à faible nombre de Reynolds, est le couplage hydrodynamique. Il repose sur l'interaction hydrodynamique entre une ou des structures (cils/flagelles) et le flux environnant. Un objet un mouvement peut donc entraîner le déplacement d'un autre objet à proximité grâce au champ d'écoulement du fluide environnant qu'il produit (cf partie II.1.2.1. ci-dessus).

Couplage hydrodynamique

La synchronisation par couplage hydrodynamique a été évaluée théoriquement par modélisation de deux oscillateurs sphériques (Brumley et al. 2014; Vilfan and Jülicher 2006; Bruot and Cicuta 2013; Maestro et al. 2018; Lagomarsino, Jona, and Bassetti 2003) ou de forme tubulaire et flexible, comme les cils ou flagelle (Gueron et al. 1997) dans de l'eau. La synchronisation décroît avec l'augmentation de la distance entre les deux oscillateurs (Brumley et al. 2014; Kotar et al. 2010) mais aussi avec la différence d'orientation de battement et la position des oscillateurs par rapport à l'axe principal de battement (Vilfan and Jülicher 2006; Hamilton and Cicuta 2018). Une synchronisation optimale est obtenue quand les oscillateurs battent dans la même direction et que l'axe de battement est aligné avec la direction définie par les deux oscillateurs (Figure 46B). Lorsque l'orientation de battement est laissée libre, le couplage hydrodynamique force les deux oscillateurs à battre dans la même orientation (Bruot and Cicuta 2013). La flexibilité et l'élasticité des oscillateurs jouent également un rôle sur la vitesse de mise en place de la synchronisation, avec une vitesse optimale pour une raideur radiale des oscillateurs autour de $1 \text{ pN}/\mu\text{m}$ (Figure 46C).

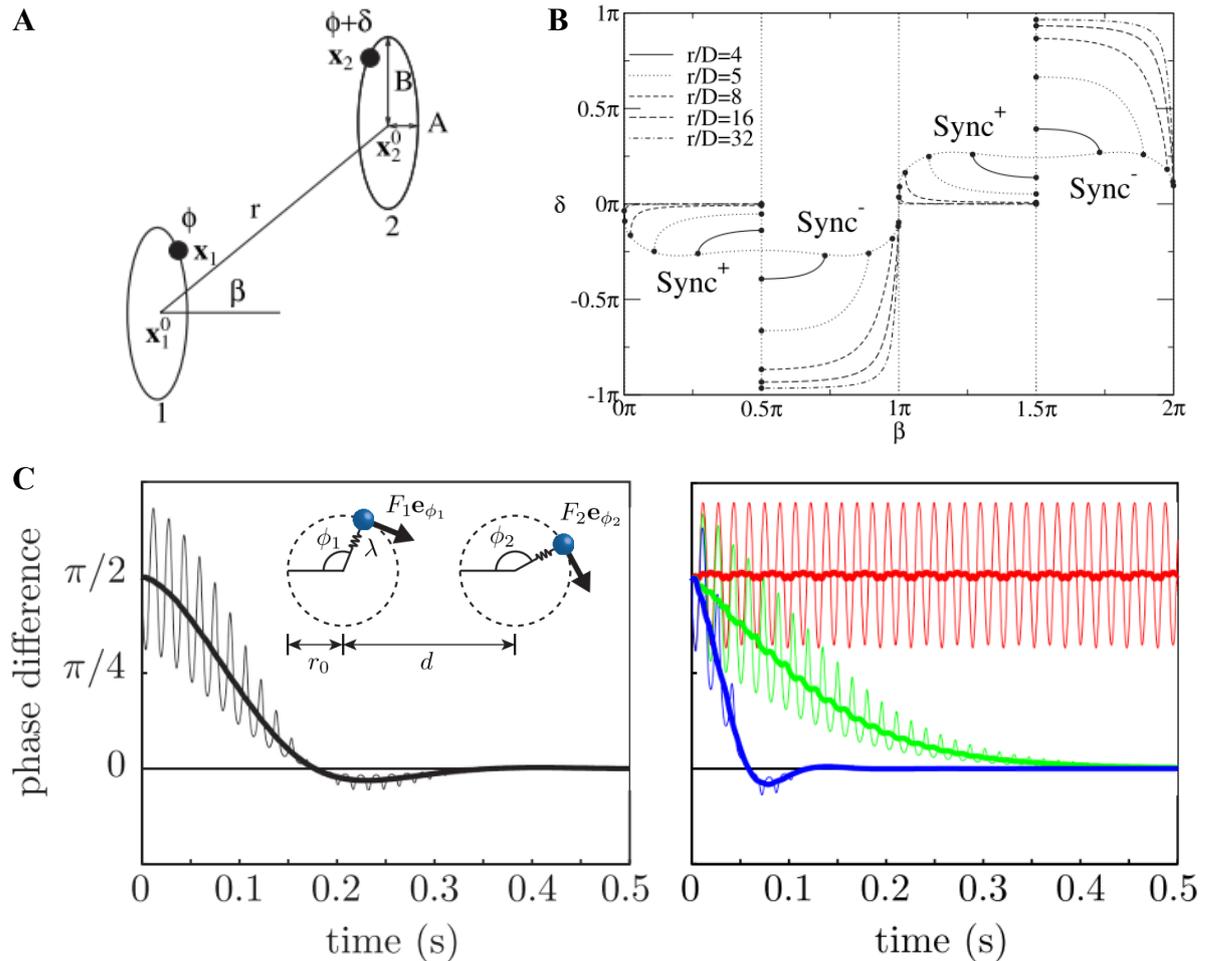


Figure 46: Synchronisation par couplage hydrodynamique de 2 oscillateurs. A) Schéma de la simulation numérique du couplage de 2 oscillateurs sphériques distants de r et β en coordonnées polaire et avec une trajectoire de battement elliptique orientée verticalement, et B) Résultats de la simulation sur la différence de phase de battement δ du couple en fonction de leur distance (r, β) avec r normalisé sur D la hauteur des oscillateurs par rapport à un plan horizontal. D'après Vilfan et Jülicher 2006. C) Déphasage du couple au cours du temps pour un écart initial de 2 rad/s pour la fréquence angulaire de battement et de $\pi/2$ pour le déphasage. La courbe permet de définir le temps de synchronisation de 2 oscillateurs sphériques à la trajectoire de battement circulaire (schéma de la simulation en encart). En noir, des oscillateurs avec une raideur radiale λ de 0,05 pN/ μ m, soit la valeur admise pour un flagelle, puis respectivement en bleu, vert et rouge, $\lambda=1$; 5 et ∞ pN/ μ m. D'après Brumley et al., 2014.

Ce couplage hydrodynamique s'observe également expérimentalement entre les flagelles de micro-organismes, comme l'algue *Volvox carteri* (Wan and Goldstein 2016; Brumley et al. 2014). Le cycle de battement de deux flagelles de longueur l maintenues à une distance d est observé de profil par vidéo-microscopie à haute vitesse d'acquisition (500 à 1000 images par seconde) puis analysé (Figure 47A). La synchronisation dépendant aussi bien de d que de l (Goldstein, Polin, and Tuval 2011), une distance caractéristique $L = d/l$ est définie. Bien que moins systématique et plus bruité (Goldstein, Polin, and Tuval 2009), la synchronisation entre les deux flagelles s'observe avec une différence de fréquence de battement nulle (Figure 47B) et un déphasage fixe dans le temps (Figure

47C) entre le couple pour une distance d inférieure à $15 \mu\text{m}$ (ou $L \sim 0,9$). En revanche, au-delà d'une distance d'environ $15 \mu\text{m}$ entre les deux flagelles, une perte rapide de la synchronisation de la fréquence (Figure 47B) et de la phase (Figure 47C) de battement du couple est observée. En calculant un paramètre de force de couplage adimensionnel κ , on observe sa décroissance en fonction de la distance caractéristique L suivant une loi de puissance en L^{-1} (Figure 47C). Le couplage hydrodynamique est donc bien un mécanisme permettant la synchronisation mais il n'opère qu'à courte distance ($\sim 15 \mu\text{m}$), soit un espacement de 2 à 3 cellules maximum. De plus, même à courte distance, le couplage hydrodynamique ne permet pas d'assurer systématiquement la coordination des cils ou flagelles.

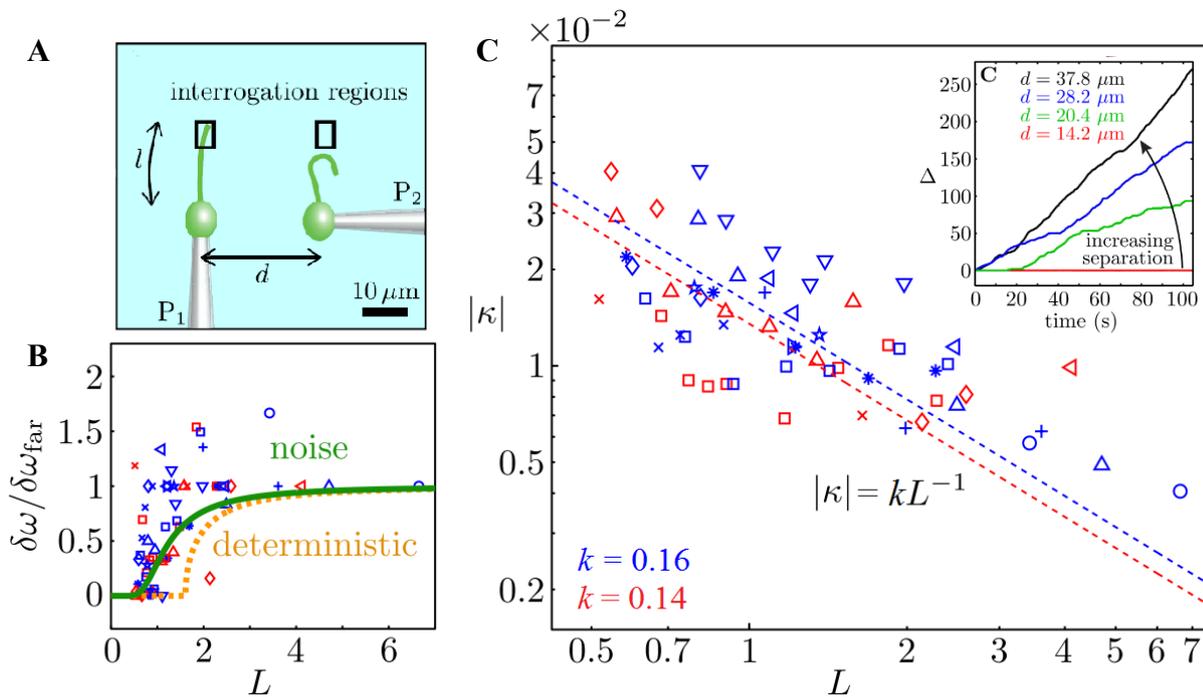


Figure 47 : Couplage hydrodynamique entre 2 flagelles. A) Schéma de l'expérience avec l'acquisition de profil en vidéo microscopie du flagelle, de longueur l , de deux cellules de *Volvox carteri* maintenues à une distance d par 2 micropipettes (P_1 et P_2). $L=d/l$ définit la distance caractéristique entre les 2 flagelles. B) La différence de fréquence de battement entre les 2 flagelles $\delta\omega$, normalisée sur celle moyennée dans le temps pour ce couple, en fonction de la distance caractéristique L du couple. Les lignes vertes continues et orange en pointillés représentent les prédictions issues d'un modèle stochastique respectivement avec ou sans bruit sur la période de battement. C) Force de couplage adimensionnelle $\kappa = 1 / \varpi 2\pi \sqrt{\delta\omega^2 + 1/(2\pi\tau_c)^2}$, avec ϖ la fréquence moyenne du couple et $\tau_c = \Delta \varpi / 2\pi$ le délai de synchronisation, avec Δ le déphasage du couple, en fonction de L . En bleu, les couples synchronisés en phase, et en rouge ceux en opposition de phase. La décroissance de $\kappa(L)$ est ajustée par une loi de puissance (lignes pointillées) dont la formule et la valeur du paramètre k sont indiquées sur le graphe. En encart, le déphasage Δ du couple est représenté en fonction du temps pour 4 distances d entre les deux flagelles. Figure d'après Brumley et al., 2014.

Autres mécanismes de couplage

Plusieurs études ont exploré d'autres hypothèses et mécanismes de couplage pour permettre la synchronisation à courte distance malgré le bruit et les fluctuations observées du battement des cils ou flagelles.

Dissipations hydrodynamique et interne. Des études théoriques (Friedrich and Jülicher 2012; Geyer et al. 2013) ont montré que le bruit est dominant sur le seul couplage hydrodynamique (Figure 48B) et que des mécanismes de dissipations hydrodynamiques par friction visqueuse et de dissipation interne augmente fortement le taux de synchronisation (Figure 48C). Cette dissipation peut s'effectuer grâce à la flexibilité et élasticité des cils ou flagelles et également, dans le cas des micro-organismes à flagelles, par le déplacement et la rotation de la cellule qui permet une meilleure synchronisation des flagelles que si les cellules sont maintenues fixes, comme démontré théoriquement et expérimentalement (Geyer et al. 2013). L'expérience de Geyer et al., montre, sur la micro-algue *Chlamydomonas reinhardtii* à deux flagelles, l'apparition d'une rotation de la cellule d'un angle α dès qu'un écart de phase se crée entre le couple, afin de rétablir la synchronisation (Figure 49).

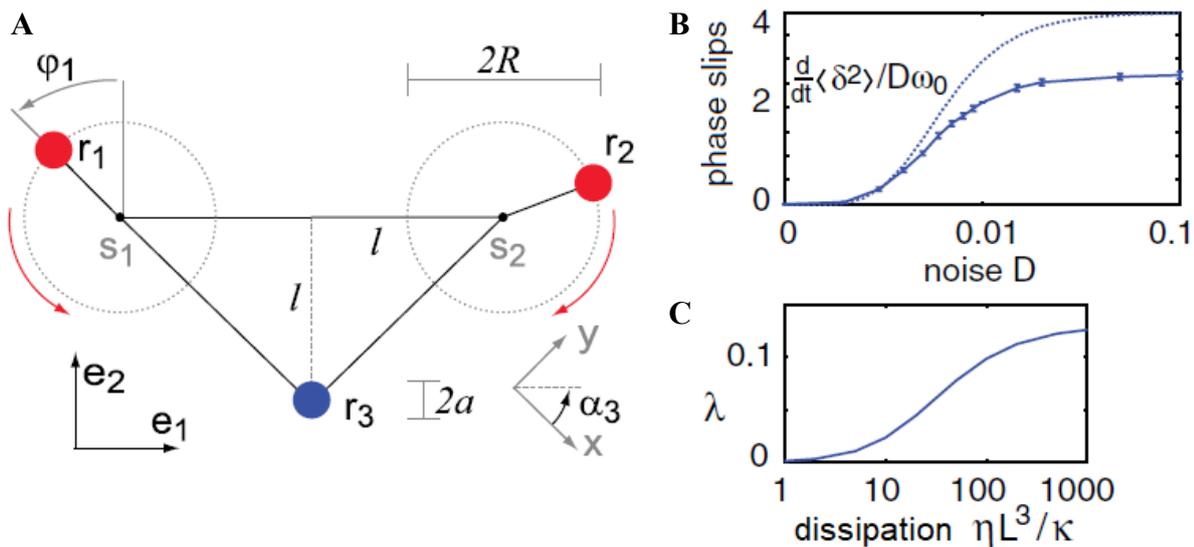


Figure 48 : Couplage hydrodynamique dominé par le bruit et mécanisme de dissipations pour améliorer la synchronisation. A) Schéma de la simulation numérique de deux sphères en rotation circulaire. B) Glissement de la somme des 2 phases δ au cours du temps $d\langle\delta^2\rangle/dt$, normalisé sur le niveau de bruit D et la fréquence angulaire de rotation ω_0 , en fonction du niveau de bruit D . C) Niveau de synchronisation $\lambda = -dA/d\delta$, avec A la différence de la somme des phases sur un cycle ($\delta(T) - \delta(0)$), en fonction de la dissipation hydrodynamique $\eta L^3 / \kappa$, avec η la viscosité du fluide, L la longueur du flagelle et κ la friction hydrodynamique. Figure d'après Friedrich et Jülicher, 2012.

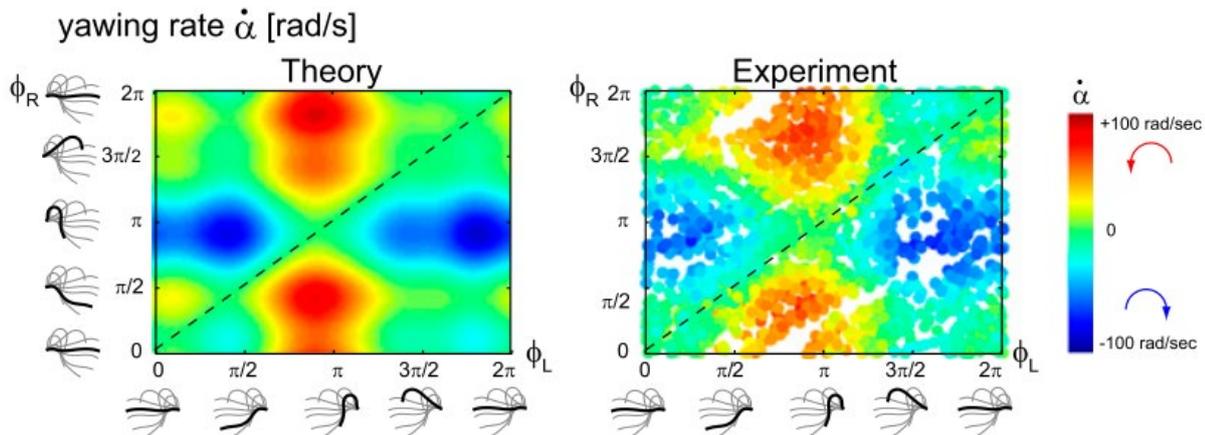


Figure 49 : Synchronisation et dissipation hydrodynamique par rotation de la cellule. L'angle α de rotation de la cellule de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* est mesuré en fonction de la phase des 2 flagelles et comparé à la prédiction issue d'une simulation numérique. Figure d'après Geyer et al., 2013.

Couplage basal intracellulaire. De plus, au sein d'une même cellule, comme abordé lors de la description de la structure du cil, la zone basale des cils, connectées entre elles au sein d'une même cellule par un réseau de filaments, joue également un rôle. L'importance de cette zone basale pour le couplage intracellulaire a été mis en évidence par Wan et Goldstein (Wan and Goldstein 2016) sur la micro algue *Chlamydomonas reinhardtii* à deux flagelles. La création d'organismes avec l'absence de filaments reliant les corps basaux des flagelles engendre une perte de la synchronisation entre les deux flagelles (Figure 50). Sur la Figure 50, on peut voir que sur trois exemples de *Chlamydomonas reinhardtii*, dont les filaments reliant la base des flagelles ont été rompus, la distribution du déphasage entre les deux flagelles est très étalée (diagramme sphérique). De plus, la différence de fréquence de battement entre les deux flagelles est très importante, avec près d'un facteur 2 (pics rouge et vert à droite de la figure). Au contraire, un *Chlamydomonas reinhardtii* 'normal' (encadré en vert sur la Figure 50) montre un très bon couplage entre les deux flagelles, visible par une même fréquence de battement et une distribution du déphasage au cours du temps très resserré de 0. Le couplage intracellulaire par les filaments entre les corps basaux est donc dominant au sein des cellules et permet de diminuer l'impact sur la coordination de fluctuations ou modifications de l'écoulement hydrodynamique du milieu.

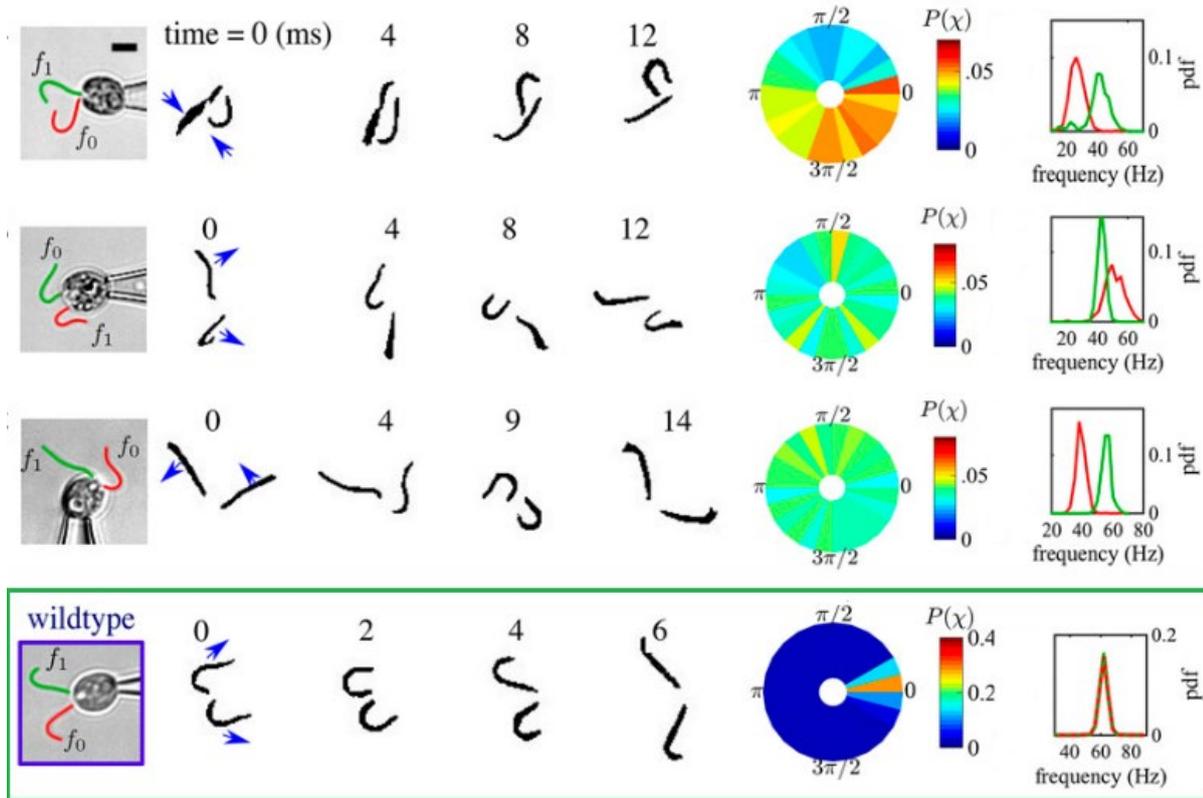


Figure 50 : Couplage basal intracellulaire. Illustration de la synchronisation du battement des deux flagelles f_0 et f_1 de la micro-algue *Chlamydomonas*, pour 3 spécimens aux filaments rompus entre les corps basaux des flagelles en comparaison d'un spécimen sein dit 'wildtype' (encadré vert). Sur les 4 spécimens, de gauche à droite : une image de l'expérience en vidéo-microscopie avec l'algue maintenu au bout d'une micropipette ; la position des 2 flagelles à 4 instants du cycle moyen de battement ; la distribution du déphasage $P(\chi)$ du couple avec un niveau de corrélation entre les 2 flagelles de respectivement pour les 4 spécimens : 0.2, 0.04, 0.04 et 0.96 ; et la distribution de la fréquence de battement des 2 flagelles sur 500 ms. Figure d'après Wan and Goldstein, 2016.

2.2.2. Battement collectif

Nous avons abordé ci-dessus les mécanismes de couplages permettant la synchronisation du battement de deux cils ou flagelles. Nous allons ci-dessous exposer la synchronisation à grande échelle d'un tapis de cils plus représentatif des épithélia ciliés. Le cas théorique d'un tapis de cils continu et homogène sera présenté un premier puis le cas plus réaliste et physiologique d'un tapis hétérogène sera discuté.

Tapis homogène

Les études théoriques sur un tapis de cils, que ce soit en 1D (Guo et al. 2014; Mitran 2007; Hanasoge, Hesketh, and Alexeev 2018; Siddiqui, Farooq, and Rana 2015; Blake 1973; Gueron et al. 1997) ou 2D (Jens Elgeti and Gompper 2013; Chateau et al. 2017), montrent une synchronisation par interaction hydrodynamique avec l'émergence d'une onde métachronale, c'est-à-dire que la rangée de cil n'est pas en phase mais qu'un déphasage fixe entre les cils se met en place. L'enveloppe de la

tête des cils à un instant t permet de dessiner la forme de l'onde métachronale qui est caractérisée par sa longueur d'onde qui dépend du déphasage entre chaque cil et sa vitesse de propagation qui dépend de la fréquence de battement. La propagation de cette onde permet le transport du fluide sur le tapis avec une efficacité 10 fois supérieure que pour le cas d'un tapis aux cils tous en phase (Jens Elgeti and Gompper 2013). En fonction du déphasage entre les cils, l'onde générée peut se propager dans le sens du battement ciliaire, ce qui définit une onde symplectique (Figure 51C), ou dans le sens inverse, ce qui forme une onde dite antiplectique (Figure 51B). Sur un tapis en deux dimensions, on peut également observer une onde qui se propage perpendiculairement à l'axe du battement ou avec un angle entre 0 et 90° (Gheber and Priel 1990; Jens Elgeti and Gompper 2013). Les caractéristiques de l'onde dépendent de celles des cils, telles que leur espacement (Chateau et al. 2017), leur longueur (Blake 1973; Hanasoge, Hesketh, and Alexeev 2018; Siddiqui, Farooq, and Rana 2015; Gheber and Priel 1990) et leur élasticité à la courbure (Hanasoge, Hesketh, and Alexeev 2018), sont des paramètres importants pour les paramètres de l'onde métachronale générée et donc l'efficacité du transport. L'onde métachronale peut également être modulée et modifiée sur des temps courts (quelques périodes de battement) par l'asymétrie entre la phase 'stroke' et 'recovery-stroke' des cils et le temps de pause marqué entre ces deux phases (Gheber and Priel 1990).

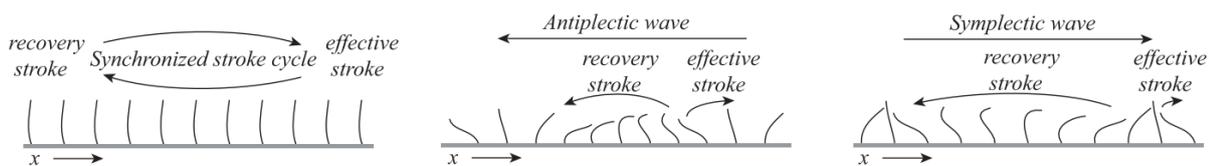


Figure 51 : Illustration de la synchronisation d'un tapis de cils en 1D et de l'onde métachronale générée. A) Cils en phase, pas d'onde métachronale. Déphasage entre les cils et formation d'une onde métachronale qui se propage B) dans le sens inverse ou C) dans le sens du battement ciliaire. Figure d'après Guo et al., 2014.

L'onde métachronale antiplectique semble plus efficace pour le transport du fluide sur le tapis (Blake 1973; Guo et al. 2014) (Figure 52B) mais c'est l'onde symplectique qui permet une force appliquée, une puissance et un couplage maximum entre les cils (Figure 52A). Guo et al. montrent également que la forme de battement type flagelle est plus efficace pour le transport (Figure 52B) et aussi plus résilient au changement de l'onde métachronale ce qui démontre que les flagelles des micro-organismes permettent un meilleur couplage hydrodynamique que les cils des épithélia ciliés. De plus, le déphasage optimal entre cils pour générer l'onde métachronale n'est pas le même entre leur modélisation basée uniquement sur un couplage hydrodynamique et celui calculé expérimentalement sur un épithélium cilié de trachée de lapin. Ce qui laisse penser que dans les systèmes biologiques, le couplage n'est pas purement hydrodynamique comme évoqué plus haut (partie II.1.2.2.1.).

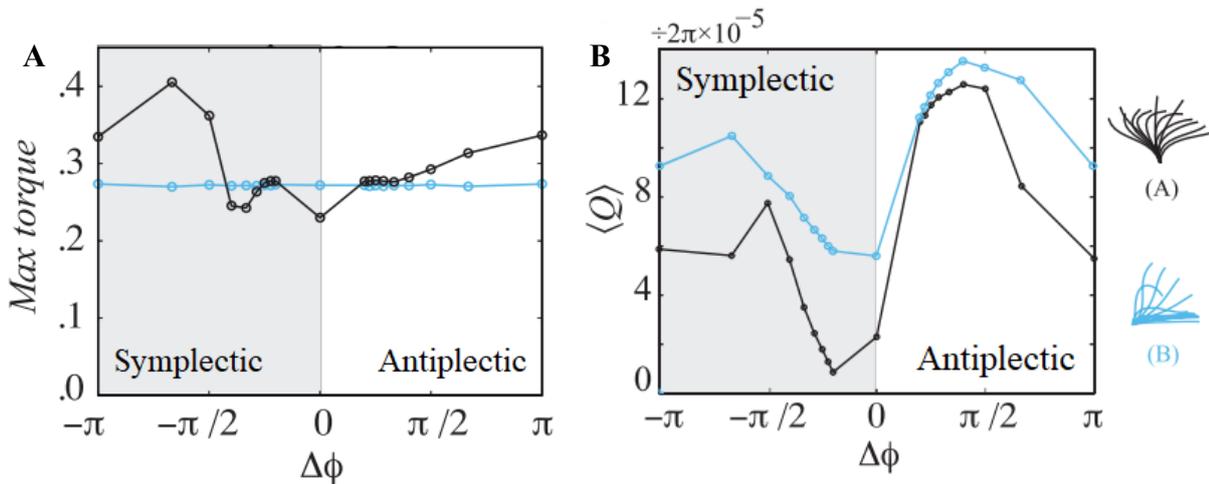


Figure 52 : Effet de la différence de phase $\Delta\phi$ entre chaque cil le long d'un tapis homogène de cils sur A) la force de couplage maximum et B) le taux de transport moyen. Les courbes noires et bleues représentent deux types de forme de battement : (A) issu des tapis ciliés et (B) issu des micro-organismes à flagelles, illustrées à droite de la figure. D'après Guo et al., 2014.

Tapis hétérogène

Les épithéliums ciliés ne sont pas des tapis de cils parfaits. Comme abordé au début de ce manuscrit lors de la description de l'épithélium des voies respiratoires, la densité surfacique de cellules ciliées est loin de 100% mais plutôt entre 40 et 80%, avec une répartition hétérogène sur le tissu. Cette distance entre cellules ciliées peut parfois dépasser la longueur maximale permise pour permettre un couplage hydrodynamique et donc la propagation d'une onde métachronale. De plus, la fluctuation des paramètres de battement tels que la phase, la fréquence, l'amplitude, mais aussi une orientation libre, peuvent perturber voire empêcher la formation d'une onde métachronale. Ainsi, l'onde métachronale est difficilement observable sur les épithélia biologiques. Due à l'hétérogénéité de la répartition spatiale des cellules ciliées, une onde métachronale globale à grande échelle n'est pas visible mais plusieurs ondes, de l'ordre de $10 \mu\text{m}$ de longueur d'onde, qui se propagent à l'échelle de quelques cellules ciliées adjacentes, sont observées (Dan Eshel and Priel 1987; Gheber and Priel 1989; Feriani et al. 2017) (Figure 53C). Sur un épithélium de palais de grenouille, le signal optique de deux cils distant de ΔX sur le tissu, acquis simultanément par spectrométrie de la lumière puis analyse du spectre obtenu, permet d'étudier la synchronisation entre deux cils sur un épithélium (Gheber and Priel 1989; Dan Eshel and Priel 1987). Des sauts de fréquences en fonction de la distance entre les cils sont observés, ce qui souligne la rupture de propagation de l'onde (Figure 53A), et le niveau de corrélation, calculé avec un facteur de Pearson, n'est optimal que pour les très faible distance ΔX entre couple, inférieur à $10 \mu\text{m}$ soit l'échelle d'une seule cellule ciliée (Figure 53B). Cette augmentation du rapport de fréquence de battement et la diminution de la corrélation en fonction de la distance ΔX sont encore plus marquées pour des couple pris au hasard sur le tissu et non le long d'un profil de battement (Gheber and Priel 1989). La fréquence de battement sur une large zone du tissu de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ est également hétérogène avec une variation de plus ou moins 3 Hz par rapport à la valeur moyenne (Feriani et al. 2017).

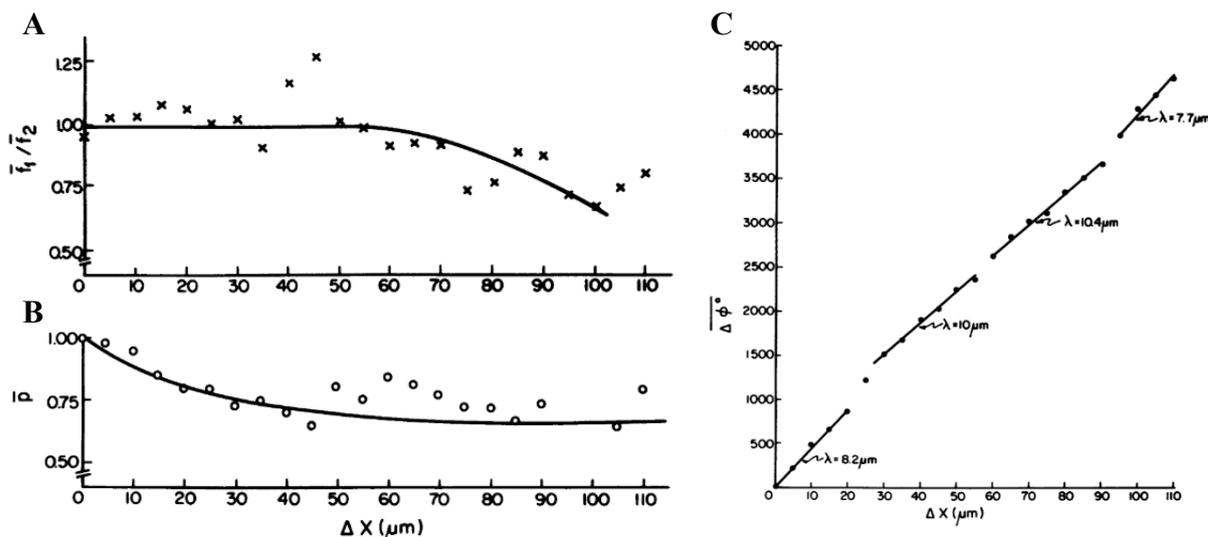


Figure 53 : Synchronisation ciliaire entre deux cils en fonction de leur distance ΔX le long d'une coupe sur un épithélium cilié de palais de grenouille. A) Le rapport de fréquence de battement entre les deux cils. B) Facteur de corrélation de Pearson moyenné sur plusieurs cycles $\bar{\rho}$ entre les deux cils. C) Déphasage moyen sur plusieurs cycles $\bar{\Delta\phi}$ entre les deux cils et longueur de l'onde métachronale λ pour les différents tronçons à la variation linéaire de $\bar{\Delta\phi}$ en fonction de la distance ΔX . Figures d'après Gheber et Priel, 1989.

La mise en place du transport, ses caractéristiques et son efficacité sur ces épithélia hétérogènes sans ondes métachronales à longue distance va être détaillé ci-dessous.

II.1.2.3. Transport mucociliaire

II.1.2.3.1. Génération du transport

Les cellules multi-ciliées et leur battement coordonné permettent le transport de la couche péri-ciliaire et du mucus à une vitesse similaire sur l'épaisseur de la couche du mucus (Matsui et al. 1998). La vitesse de transport peut être différente en fonction des propriétés des deux couches, du nombre et de la configuration des cellules ciliées ou encore de la géométrie du tissu. Par exemple, au sein de l'appareil respiratoire, la vitesse de transport est plus importante dans la trachée, entre 60 et 250 $\mu\text{m/s}$ (Oldenburg et al. 2012; Hoegger et al. 2014; L. Liu et al. 2014; Foster, Langenback, and Bergofsky 1980; Chu et al. 2016; L. Liu et al. 2013), que dans les bronches dont le diamètre et la longueur des segments sont plus faibles, avec une vitesse entre 5 et 80 $\mu\text{m/s}$ (P. A. Vasquez et al. 2016; Foster, Langenback, and Bergofsky 1980; Juan et al. 2019).

Les propriétés du fluide et la géométrie du tissu ont un rôle sur les effets de bords causés par le confinement du tissu. Ces effets peuvent conduire à des orientations et un champ de transport différent à l'échelle locale (dizaine de cellules ($\sim 50 \mu\text{m}$)) et à l'échelle globale ($> 1 \text{ mm}$). Cela est

particulièrement visible sur des cultures d'épithélium, qui ont une géométrie circulaire (membrane du puits), avec la formation d'un « vortex » à l'échelle globale, plus ou moins centré sur le centre du puits (Figure 54A). Ces vortex semblent se former systématiquement lorsqu'un liquide est ajouté sur le tissu, avec une vitesse de transport qui augmente linéairement avec l'éloignement au centre du puits (P. A. Vasquez et al. 2016; Khelloufi et al. 2018; Matsui et al. 1998), bien que des vortex puissent également être observés dans du mucus pur, sans ajout de fluide (Oldenburg et al. 2012; Carpenter et al. 2018). Alors que pour d'autres observations, sans fluide ajouté, seules des vortex locaux apparaissent et à l'échelle globale le transport ressemble plus à une rivière sinueuse avec de nombreux bras et méandres (Figure 54B). Une étude par simulation numérique montre la formation de ces vortex par l'émergence d'un écoulement secondaire du fluide et la stabilité temporelle du vortex en fonction du type de fluide (P. A. Vasquez et al. 2016). L'épithélium cilié est simulé par un disque plat en rotation avec une vitesse angulaire cyclique et asymétrique afin de mimer la phase de battement et celle de recouvrement du cil. Dans le cas d'un fluide Newtonien, un vortex stable et constant dans le temps se met en place rapidement (< 1 ms). Dans le cas d'un fluide viscoélastique un vortex se forme également mais moins rapidement et le vortex n'est pas constant dans le temps avec des disparitions momentanées et des inversions du sens de rotation du vortex. D'autres simulations en prenant une géométrie tubulaire, comme les voies aériennes, montrent l'importance des effets de bord et de résonance dus au flux d'air (Fredberg 1978) et aux ondes métachronales issues de l'activité ciliaire sur le transport (Blake 1973; Mercier, Garnier, and Dauxois 2008).

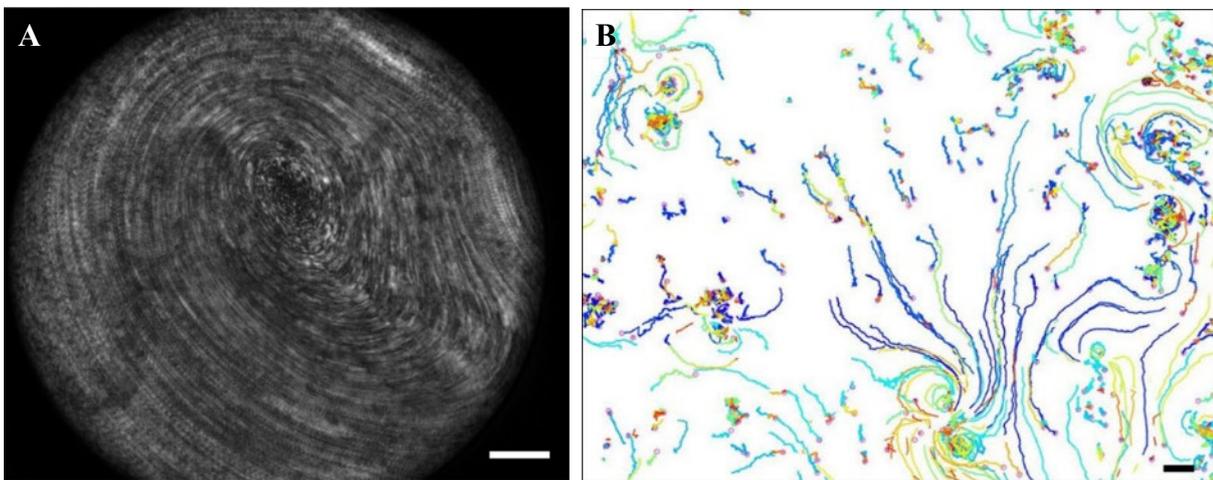


Figure 54 : Transport à l'échelle globale du mucus sur un épithélium sphérique (puits de culture). A) Cas de la formation d'un vortex à grande échelle. Barre d'échelle : 200 μm . B) Cas sans vortex avec de nombreux méandres et vortex locaux. Barre d'échelle : 20 μm . Le champ de transport est obtenu sur un épithélium bronchique humain issu de cultures ALI par vidéo-microscopie et suivi des traceurs (microbilles) préalablement placés dans le mucus. Figure d'après Khelloufi et al., 2018.

Cette dépendance de l'organisation globale du transport à la géométrie finie du tissu est un mécanisme que l'on retrouve dans toutes les observations expérimentales réalisées. Nous allons ci-

dessous approfondir le rôle des propriétés des fluides et de l'hétérogénéité du tapis ciliaire sur l'efficacité du transport.

II.1.2.3.2. Impact des propriétés du fluide sur le transport

Les propriétés viscoélastiques, mais aussi adhésives, sont importantes pour le couplage mucociliaire et l'efficacité du transport. Mais ces propriétés doivent être ajustées avec soins pour permettre aux cils de pénétrer et propulser le mucus et de maintenir un équilibre osmotique avec la couche péri-ciliaire afin d'éviter l'écrasement des cils. Comme abordé précédemment dans la partie I (I.1.2., Figure 7C), il y a une corrélation entre la pression osmotique du mucus, qui réduit l'épaisseur de la couche péri-ciliaire lorsque elle augmente (B. Button et al. 2012), et l'efficacité du transport (Boucher 2019). Cette pression osmotique peut être modifiée par la composition du mucus, notamment sa concentration ou dilution, ou la variation brutale du volume de la couche (ajout ou retrait de mucus). Les propriétés du fluide influent également sur les effets de bord dus à l'espace fini et confiné de l'épithélium, ce qui peut conduire à une modification de l'orientation et du champ de vitesse globale du transport en fonction de la géométrie du tissu.

Effet de la viscosité. La viscosité du mucus modifie les propriétés d'écoulement du mucus et la pression osmotique de la couche. Ainsi, une augmentation de la viscosité est supposée diminuer l'efficacité du transport et réduire l'épaisseur de la couche péri-ciliaire. Plusieurs études ont portées sur les impacts de la viscoélasticité du mucus, ou d'un fluide similaire, sur sa vitesse de transport (L. Liu et al. 2014; Puchelle, Zahm, and Quemada 1987; Boucher 2019; Puchelle and Zahm 1984; P. A. Vasquez et al. 2016; Chatelin et al. 2017). Grâce à des solutions de gomme de Xanthane de concentrations et viscosité différentes, déposées sur un épithélium cilié de palais de grenouille et filmé par vidéo-microscopie, une étude de Puchelle et al., 1987 quantifie expérimentalement les effets de la viscosité sur la vitesse de transport. Ils montrent que l'efficacité du transport ne diminue pas linéairement avec la viscosité mais passe par un maximum avec une augmentation de la vitesse de transport entre 0 et 10 Pa.s puis une diminution jusqu'à un arrêt du transport au-delà de 50 Pa.s (Figure 55). Comme abordé dans le couplage, un fluide viscoélastique, comparé à l'eau, semble augmenter l'efficacité de la propulsion du cil et de son couplage avec le fluide, ce qui augmente l'efficacité du transport mucociliaire. Mais lorsque le fluide devient trop viscoélastique, l'efficacité est réduite due à l'effet conjoint de l'augmentation de la résistance du fluide à la pénétration du cil et, dans le cas d'épithéliums ciliés, l'augmentation de la pression osmotique de la couche qui réduit l'épaisseur de la PCL et écrase les cils. Ces observations expérimentales sont rejointes par une simulation numérique 3D comprenant un tapis homogène de cils générant une onde métachronale sur le modèle d'un couplage hydrodynamique avec un écoulement de Stokes non linéaire, dans deux couches de fluide : un fluide newtonien pour simuler la PCL, d'épaisseur variable δ exprimée relativement à la longueur des cils, et un fluide viscoélastique rhéofluidifiant pour représenter la couche de mucus (Chatelin et al. 2017). La viscosité η du mucus est modélisée et variée grâce aux deux paramètres K et N de sa variation en loi de puissance en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$, soit $\eta = K\dot{\gamma}^{N-1}$, et la propulsion

du fluide par l'onde métachronal générée suit le modèle de Carreau. L'étude montre la diminution de la vitesse du transport avec la réduction de la PCL (Figure 56B), mais également l'augmentation de la vitesse avec la viscosité (paramètre K) et la diminution du comportement rhéofluidifiant du fluide (paramètre N) dans le cas d'une épaisseur normale de la PCL ($\delta=0,7$; Figure 56A).

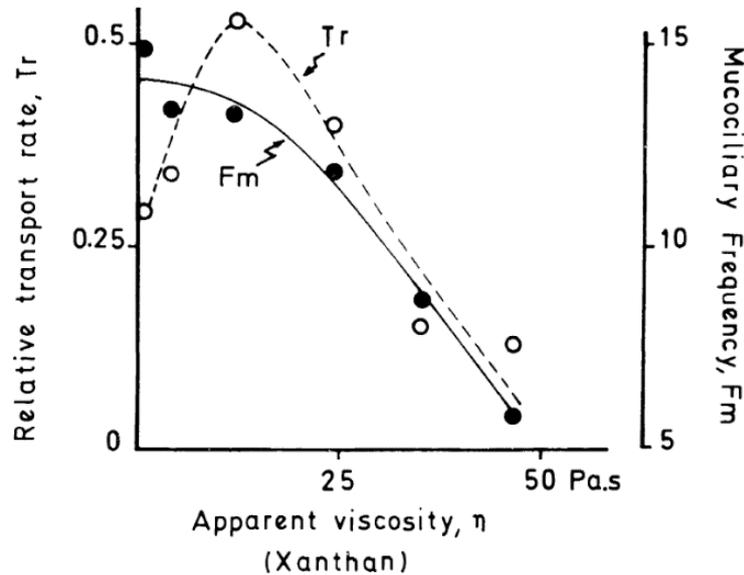


Figure 55 : Impact de la viscosité du fluide sur la fréquence de battement des cils et l'efficacité du transport. Le taux de transport Tr (relativement au mucus natif) (ronds vides) et la fréquence de battement ciliaire F_m (ronds pleins) sont mesurés en fonction de la viscosité du fluide (solution de gomme de Xanthane). L'épithélium cilié est issu d'un palais de grenouille. Figure d'après Puchelle et al., 1987.

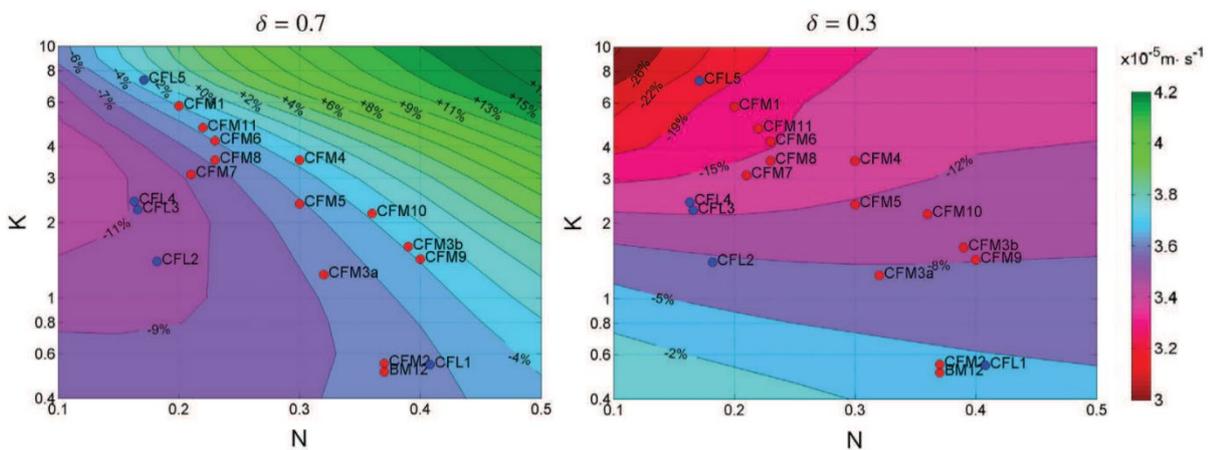


Figure 56 : Impact de la viscosité du mucus et de l'épaisseur δ de la couche péri-ciliaire PCL relativement à la hauteur des cils sur la vitesse de transport du mucus (code couleur). Les valeurs de K et N réfèrent aux paramètres de loi de puissance de la viscosité η du mucus avec $\eta = K\dot{\gamma}^{N-1}$. Les données sont générées par un modèle comprenant une cellule rectangulaire de 25 cils de $8 \mu\text{m}$ de longueur battant à 10 Hz. La viscosité de la PCL est fixée à 1 mP.s. Les points bleus et rouges représentent les valeurs de mucus bronchique de patients atteints de mucoviscidose. Figure d'après Chatelin et al., 2017.

Effet de l'adhésion. L'impact de l'adhésion (Girod et al. 1992) ou de la capacité de filetage (Puchelle, Zahm, and Duvivier 1983) du mucus sur l'efficacité du transport a déjà été abordé dans la partie I.1.4. (Figure 17B et Figure 19C). Il a été montré que la vitesse de transport diminue avec l'augmentation de l'adhésion du mucus et que la capacité de filetage du mucus et son efficacité de transport sont corrélées.

Effet de la charge. La charge est définie comme le poids du mucus sur l'épithélium qui peut être modulé par une modification brusque de l'épaisseur de la couche. Une étude s'intéresse à l'effet de l'augmentation de la charge, comme celle provoquée par un amas de mucus, sur l'épithélium et l'activité ciliaire (L. Liu et al. 2014). L'expérience est réalisée sur un épithélium de trachée de porc issu de cultures, imagé par micro-tomographie par cohérence optique (μ OCT en anglais). A la suite de l'invasion, les auteurs observent une augmentation brutale de la fréquence du battement ciliaire et de la vitesse de transport, accompagnée d'une réduction de l'épaisseur de la PCL (Figure 57). Au bout de quelques minutes, le système se rééquilibre grâce à l'auto-régulation de l'épithélium en évacuant ou absorbant une partie du mucus ajouté. De plus, l'état du système est réversible car après le retrait de la charge ajoutée, la fréquence de battement, la vitesse de transport et l'épaisseur de la PCL retrouvent leurs valeurs initiales après quelques minutes (Figure 57).

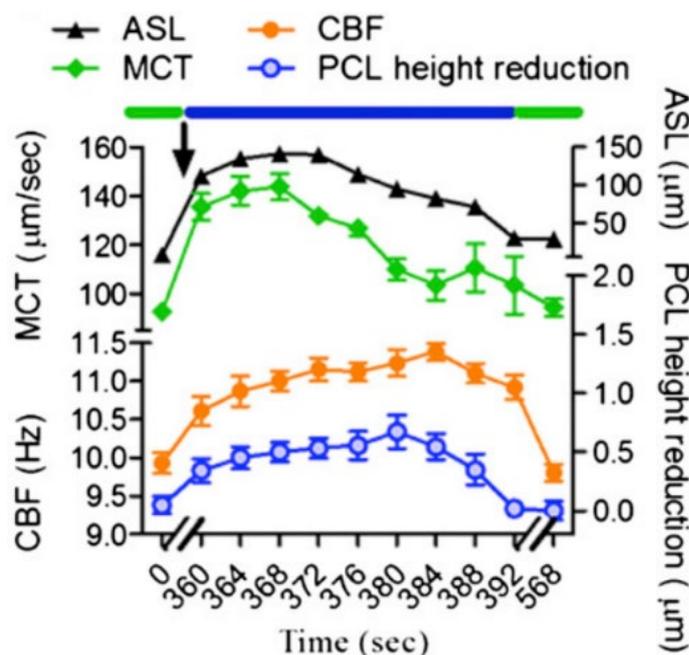


Figure 57 : Impact d'une augmentation du poids de la couche de mucus sur l'épithélium. Les effets au cours du temps d'une augmentation brusque du volume de mucus sur l'épaisseur de la couche péri-ciliaire PCL (bleu) et la couche de mucus ASL (noir), la fréquence de battement des cils CBF (orange) et la vitesse de transport du mucus MCT (vert), sont mesurés par μ OCT. La plage bleue en haut représente la durée de l'expérience après l'ajout du volume de mucus, symbolisé par la flèche noire. Les deux plages vertes, avant et après, représentent le système sans la charge de mucus supplémentaire. L'épithélium est celui de la trachée de porc issu de cultures. Figure d'après Liu et al., 2014.

Rôle de la gravité. Les propriétés viscoélastiques et adhésives du mucus sont essentielles pour l'efficacité de son transport. Dans l'arborescence des voies respiratoires, l'épithélium est rarement à l'horizontale, ce qui signifie que le mucus est soumis à la gravité. Une étude de Carpenter et al., 2018, a exploré les effets de la gravité sur le transport en fonction du type de fluide sur un épithélium bronchique humain issu de culture. L'épithélium est filmé par vidéo-microscopie et le déplacement des microbilles traceurs (2 μ m) déposées dans le mucus pour le fluide viscoélastique, ou le PBS pour le fluide newtonien, est mesuré par PIV ('Particle Image Velocimetry' en anglais). L'épithélium est incubé à l'ATP puis au DTT et rincé au PBS avant l'expérience pour éliminer toute trace de la couche initiale de mucus. Ils ont montré l'absence de transport d'un fluide purement visqueux (solution tampon PBS) dans des voies verticales alors que le transport du mucus viscoélastique est peu affecté par l'inclinaison du tissu (Figure 58) (Carpenter et al. 2018).

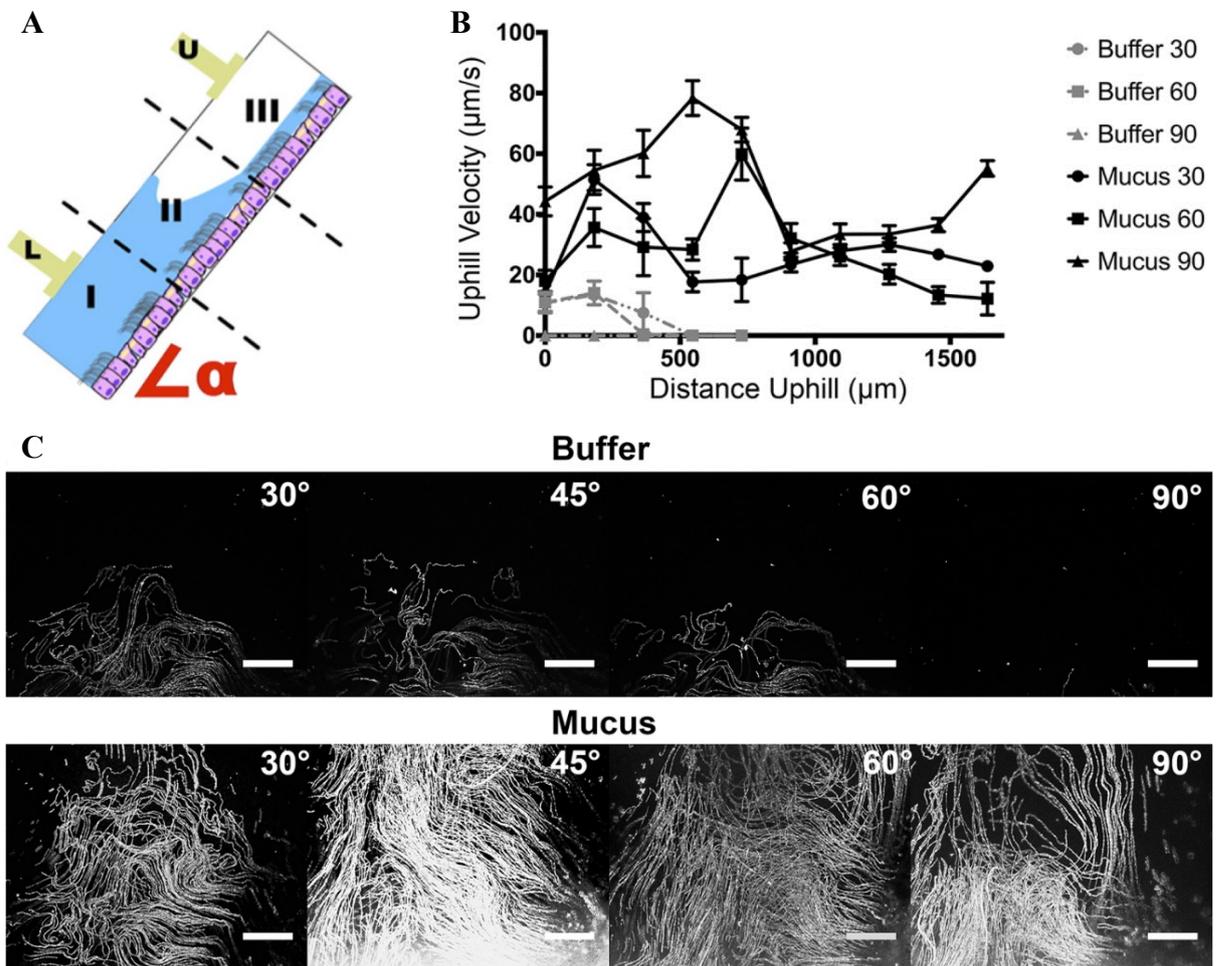


Figure 58 : Effet de la gravité sur le transport d'un fluide purement visqueux (buffer) ou d'un fluide viscoélastique comme le mucus. A) Schéma du dispositif expérimental. Le microscope et sa platine sont eux aussi inclinés. Chaque bloc (I, II, III) représente 500 μ m. B) Vitesse de transport du liquide Newtonien tampon ('buffer', courbes grises) et du mucus (courbes noires) en fonction de la distance à l'extrémité basse du plan et de l'angle α d'inclinaison (symboles). C) Représentation du champ de transport (chemins des particules fluorescentes) pour la solution tampon (en haut) et le mucus (en bas) en fonction de l'angle d'inclinaison. Barres d'échelles : 200 μ m. Figures d'après Carpenter et al., 2018, sur de l'épithélium bronchique humain issu de cultures ALI.

II.1.2.3.3. Rôle de l'hétérogénéité de l'activité ciliaire

Les épithélia ciliés ne sont pas des tapis entièrement couverts de cils, au battement homogène en termes d'orientation, de fréquence et de phase. Ce sont des tissus hétérogènes, en termes de répartition spatiale des cellules ciliées et de leur activité, même dans le cas d'épithéliums très densément ciliés ($> 80\%$), comme celui des ventricules cérébraux pour la circulation du fluide cérébro-spinal. Cette hétérogénéité se retrouve dans le transport du fluide sur l'épithélium à l'échelle locale ($< 50 \mu\text{m}^2$), avec des vitesses et orientations diverses et la formation de vortex et de points triples (Figure 59). Mais à l'échelle globale, le transport est organisé et suit l'orientation et la direction de battement des cellules ciliées (Figure 59) (Faubel et al. 2016; Khelloufi et al. 2018; Carpenter et al. 2018; Oldenburg et al. 2012).

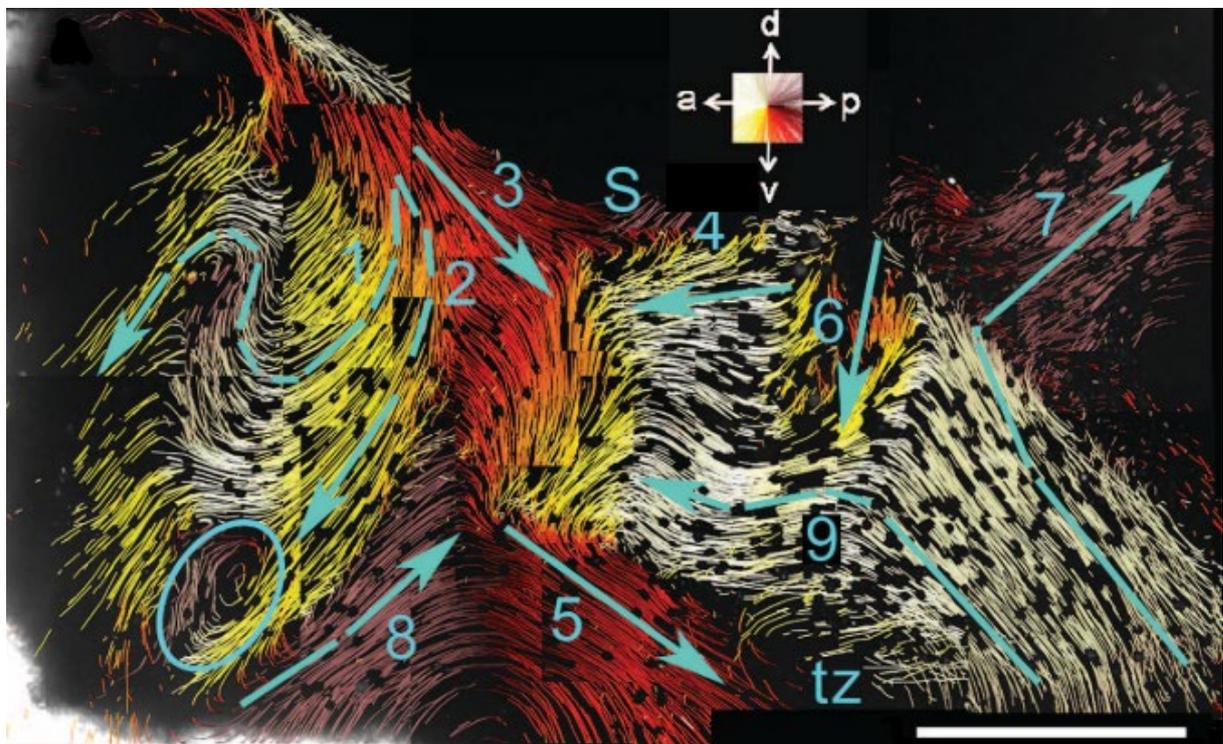


Figure 59 : Hétérogénéité locale et organisation globale du transport par les épithéliums ciliés. La figure représente un épithélium de ventricule cérébrale de rat (3^e ventricule ventral) et le transport du fluide cérébro-spinal est acquis par vidéo-microscopie puis grâce au suivi de microbilles fluorescentes (latex, $1 \mu\text{m}$) dont chaque trajectoire est représentée par un segment dont la couleur représente l'orientation. Les grandes flèches symbolisent l'orientation et le sens de transport de chaque bloc du ventricule. Barre d'échelle : 1 mm. Figure d'après Faubel et al., 2016.

L'orientation de battement des cils et son hétérogénéité ont donc un rôle important dans la modulation du transport et son organisation spatiale. Une étude de Juan et al., 2019 (Juan et al. 2019) s'intéresse à l'impact sur l'efficacité du transport de différentes sources d'hétérogénéité de l'épithélium : la densité de cellules ciliées ; la distance entre les cellules ou les amas de cellules

ciliées ; le paramètre d'ordre dans l'orientation des amas ; et le paramètre d'ordre dans l'orientation de battement des cils (Figure 60A). Cette analyse est réalisée grâce à une simulation 3D avec des patchs de cils, dont la répartition est variée, avec un couplage hydrodynamique respectant un écoulement de Stokes suivant la fonction de Stokeslet (ou Green), dans un fluide Newtonien d'épaisseur H . En s'inspirant de l'approche dite de l'enveloppe (Lighthill et Blake), la vitesse de propulsion des cils est calculée et la vitesse du fluide qui en résulte est déterminée en respectant la loi de Navier-Stokes pour un fluide incompressible, à faible nombre de Reynolds ($Re \ll 1$). L'étude montre que l'efficacité décroît avec la diminution de la densité de cils (Figure 60B). En revanche, l'espacement entre les groupes de cellules ciliées (Figure 60C) et le paramètre d'ordre dans l'orientation et la géométrie des groupes (Figure 60D) n'ont pas d'impact sur l'efficacité du transport jusqu'à un seuil critique qui marque une perte exponentielle de l'efficacité. Mais de façon plus surprenante, l'étude met en évidence qu'un léger désordre dans l'orientation de battement ($\sim 0,9$) est plus efficace qu'un ordre d'orientation parfait (Figure 60E). Les auteurs l'expliquent par la théorie de la résonance stochastique qui augmente la performance d'un système non linéaire au couplage d'un signal périodique et d'un événement aléatoire (bruit).

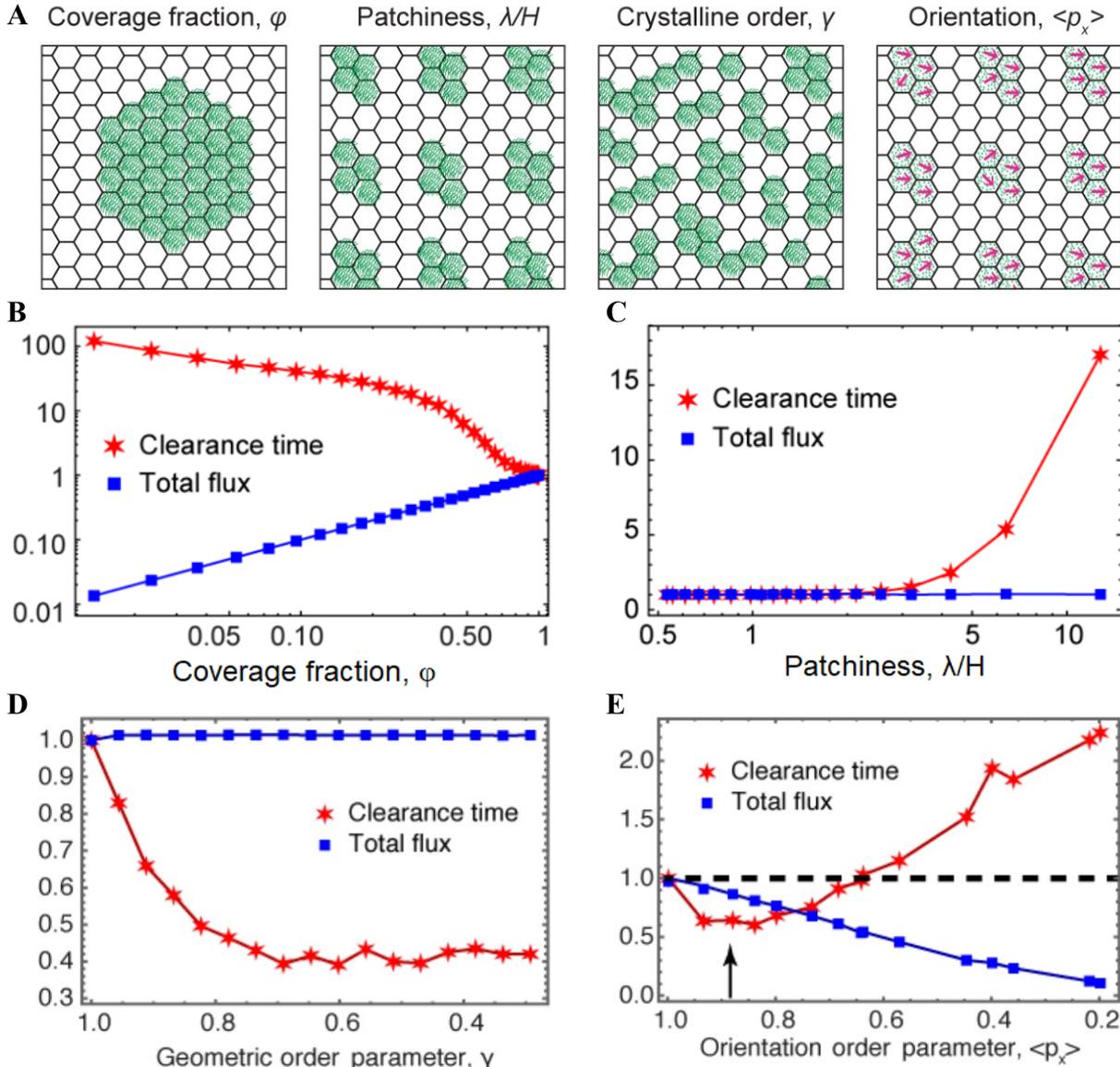


Figure 60 : Rôle de l'hétérogénéité du tapis ciliaire sur l'efficacité du transport. A) Schéma des quatre paramètres d'hétérogénéité étudiés : la densité surfacique de cils ϕ , le rapport de l'espacement entre groupe de cils λ et l'épaisseur de la couche H , le paramètre d'ordre d'orientation et géométrie des groupes de cils γ et le paramètre d'ordre de battement des cils $\langle p_x \rangle$. L'efficacité du transport est représentée par le temps d'évacuation de la couche (temps que met une particule pour effectuer la largeur L de la zone), normalisé sur le temps sans hétérogénéité pour le paramètre considéré (étoiles rouges), et par le flux total qui correspond à la vitesse sur l'axe x , intégré sur l'axe y et z , normalisée sur le flux total sans hétérogénéité (carrés bleus), en fonction des quatre paramètres : B) ϕ , C) λ/H , D) λ , et E) $\langle p_x \rangle$. Figure d'après Juan et al., 2019.

Bien que l'hétérogénéité du tapis ciliaire et l'émergence de défauts locaux dans le champ de transport du fluide puissent réduire la vitesse du transport, des études (Nawroth et al. 2017; Mathijssen et al. 2018) ont montré l'intérêt des défauts d'orientation, comme les points triples et les vortex locaux, et d'une turbulence du transport, pour piéger les pathogènes (Figure 61) ou recruter les nutriments et autres éléments utiles. L'efficacité du transport mucociliaire pour maintenir un

épithélium sain ne doit donc pas être pensée seulement sous le prisme de la vitesse de l'évacuation du mucus.

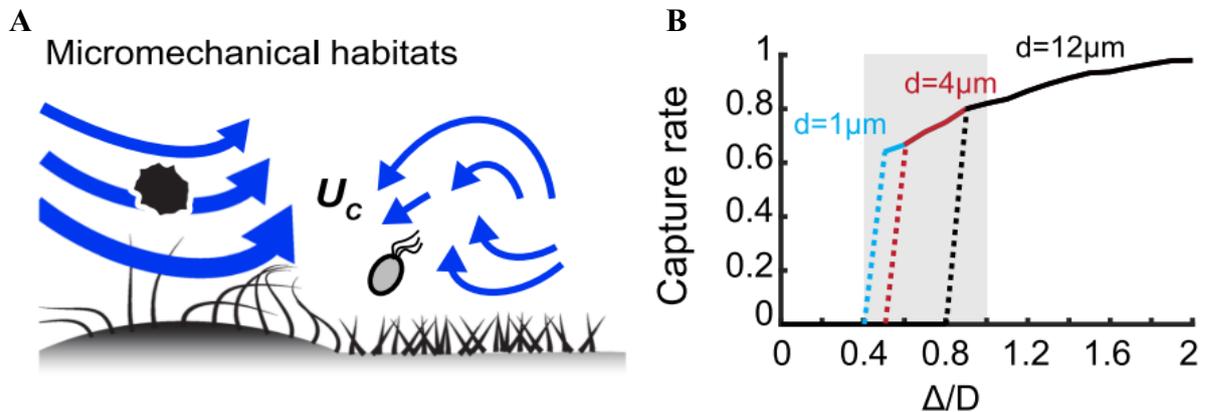


Figure 61 : Capture des particules et pathogènes par des hétérogénéités et défauts locaux de transport. A) Schéma de la capture sélective d'objets grâce à un défaut dans le champ de transport dû à une aspérité de l'épithélium et une différence de longueur des cils. B) Pour une simulation d'un défaut de transport sur un plan par deux disques en rotation inverse, de diamètre D et espacé de Δ , le taux de capture de particules sphériques de diamètres d est représenté en fonction du rapport Δ/D , soit la taille et la géométrie de la zone de défaut de transport créé. Figures d'après Nawroth et al., 2017.

II.1.3. Conclusion : complexité et modulation de la coordination ciliaire et du transport associé

La synchronisation du battement ciliaire repose sur plusieurs mécanismes dont les principaux sont : le couplage hydrodynamique, la dissipation des forces de friction, et le couplage basal intracellulaire. Cette synchronisation permet un transport organisé du fluide sur le tissu malgré l'hétérogénéité de l'activité ciliaire, grâce à l'organisation de l'orientation de battement. L'efficacité du transport peut être augmentée localement par l'émergence d'ondes métachronales, sur moins d'une dizaine de cellules ciliées adjacentes. Les défauts d'orientations de battement et de synchronisation ont quant à eux un rôle de piège pour capturer les micro-organismes et particules pathogènes et/ou recruter les éléments utiles. De plus, la communication interciliaire et la régulation intraciliaire permettent de moduler le cycle du battement du cil afin de l'adapter aux changements de son environnement (propriétés du fluide, agression du tissu, ...) et donc modifier le couplage et le transport associé.

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes interrogés sur la quantification et la caractérisation de la coordination ciliaire de l'échelle locale (d'une cellule à une centaine), sur un épithélium bronchique humain. L'étude expérimentale de la coordination à l'échelle du cil, sur un épithélium cilié, a très peu été explorée à notre connaissance, à part par l'équipe d'Eshel, Gheber et Priel dans les années 1980, du fait de la difficulté d'imager et d'analyser le cycle de battement à

l'échelle du cil sur ces tissus. La majorité des études expérimentales sur épithélium se concentrent sur une caractérisation plus globale de la coordination (Feriani et al. 2017; Khelloufi et al. 2018). Nous avons cherché à répondre à trois points en particulier. Quel est le niveau de coordination spatio-temporelle et quelles sont ses caractéristiques malgré l'absence d'ondes métachronales ? Quel est l'effet d'un changement de l'environnement (propriétés du fluide, densité de cils, drogues) sur l'activité ciliaire et le transport du mucus associé ? La caractérisation de l'activité ciliaire et du transport des cultures ALI peut-elle servir comme marqueur des pathologies respiratoires, notamment de la BPCO ? Ces questions, notamment sur la coordination, nous ont poussé à développer un protocole d'acquisition et surtout une méthode de traitement originale, afin d'obtenir la trajectoire spatio-temporelle de petits groupes de cils sur une zone spatiale de plus de $250 \times 250 \mu\text{m}^2$.

II.2. Méthodes d'acquisition, de traitement et d'analyse des vidéos

II.2.1. Acquisition du battement ciliaire et du transport du fluide par vidéo-microscopie

II.2.1.1. Paramètres généraux d'acquisition

Les cultures d'épithéliums bronchiques humains (cf chapitre sur le modèle de culture ALI dans la partie introductive sur l'épithélium bronchique 3.2) sont observées sous microscope (Leica DMI 3000 B) et l'activité ciliaire et/ou le transport dans le mucus sont filmés grâce à une caméra rapide (Photron Fastcam PCI 1024). Pour l'activité ciliaire, la focalisation est choisie afin de discerner au mieux les différents groupes de cils dans les cellules avec un contraste d'intensité lumineuse de 50 environ sur nos images en 8 bits d'intensité comprise entre 0 et 255. Pour le transport, la focalisation est faite dans la couche de mucus ou fluide à quelques micromètres des cils. L'acquisition du transport nécessite préalablement l'incorporation d'objets sondes dans le mucus ou de fluide (voir détails ci-dessous). Le grossissement et la fréquence d'acquisition sont adaptés en fonction de la vitesse de déplacement des objets (cils ou billes) et des paramètres que l'on souhaite obtenir. Les acquisitions se font à 37°C et avec une atmosphère maintenue à 5% de CO₂ grâce à une chambre d'observation (Okolab) montée sur la platine du microscope. La majorité des acquisitions sont faites avec les épithéliums laissés dans leur boîtier de culture de 12 puits. Mais la faible distance de travail permise par les objectifs à fort grossissement (comme le x100 à immersion à huile), et l'importance de la qualité optique des vidéos pour le succès des traitements et analyses qui vont suivre, notamment pour celles de la coordination, nous ont amené à sortir le puits de culture de leur boîtier stérile. Une boîte circulaire de 50 mm de diamètre, avec au fond une lame de verre optique, a été préparée. Elle permet de disposer directement le filtre sur lequel repose l'épithélium sur le verre optique, sur lequel est déposé préalablement une goutte de milieu nutritif (~5 µl) afin qu'un film de liquide se forme pour éviter la déshydratation et dénutrition du tissu. Des précautions de propretés sont prises bien que la chambre ne soit pas stérile. La boîte est nettoyée dans un mélange éthanol/eau (70/30), puis rincée à l'eau distillée et sécher au pistolet à azote, et enfin placer 1h sous UV avant sa réutilisation.

L'activité ciliaire et le transport associé ont été observés dans plusieurs conditions (drogues, fluides, ...) et avec différents niveaux d'informations recherchés (quantification de la coordination ciliaire ou simple comparaison de l'activité ciliaire en termes de densité de cellules ciliées qui battent, de fréquence de battement et de vitesse du transport). Les particularités des acquisitions pour chaque cas et le mode d'application des fluides ou drogue sur le tissu sont détaillés ci-dessous.

II.2.1.2. Acquisition de l'activité ciliaire

Caractérisation de la densité et de la fréquence de battement. Pour comparer plusieurs épithéliums entre eux, suivre l'évolution en fonction de la maturité de la culture ou encore observer

l'effet de drogues ou de la viscoélasticité du fluide sur l'activité ciliaire, une première analyse sur la densité de cellules ciliées qui battent sur le tissu et leur fréquence de battement est effectuée. L'obtention de ces deux paramètres ne nécessite pas une résolution et une qualité optique optimales des films. Les acquisitions sont donc réalisées au grossissement x40 ou x63 dans le boîtier de culture, à 250 ou 500 images par seconde en fonction de la fréquence de battement observée. Les acquisitions peuvent être effectuées avec les billes ajoutées comme traceurs pour le transport (voir ci-dessous II.2.1.3) ce qui assure une concordance des conditions et de la zone spatiale entre les données de l'activité ciliaire et du transport du fluide.

Observation de la coordination ciliaire. Le battement ciliaire est acquis avec le puits directement sur une lame de verre optique au grossissement x63 avec une fréquence d'acquisition de 500 images par secondes. La conversion pixel-micromètres est de 0,273 $\mu\text{m}/\text{px}$. Exceptionnellement, les vidéos peuvent être prises au grossissement x100 (immersion à huile) à 1000 images par seconde (0,169 $\mu\text{m}/\text{px}$). Dans ces acquisitions, les billes ne sont jamais présentes pour ne pas gêner le signal optique des cils. Ces observations sont effectuées sur toutes les cultures BEGM et sur les cultures PneumaCult avant J21.

II.2.1.3. Acquisition du transport du mucus ou du fluide

L'observation du transport dans le fluide nécessite la présence de traceurs. Pour cela l'ajout de microbilles isotropes est privilégié lorsque cela est possible. Ci-dessous est détaillé le type de traceur suivi et son mode d'application dans le fluide ou le mucus en fonction des différents types de culture (milieu BEGM ou PneumaCult) et des fluides ajoutés.

Préparation des billes sondes. Les billes de latex de 0,5 μm de diamètre (Sulfate latex 8% w/v, Invitrogen, Molecular Probes) sont préalablement lavées 3 fois dans de l'eau distillée et stockées à 1% w/v à 4°C pour les futures utilisations. Ces billes seront ensuite dispersées dans le fluide choisi (mucus BEGM prélevé, PBS, milieu nutritif, mucus synthétique) à une concentration de 0,01 % w/v.

Cultures BEGM. Le mucus surnageant est prélevé et complété si besoin avec du mucus provenant de la même culture (prélevé les jours précédent) afin d'obtenir 50 μL . Les billes de latex y sont incorporées, puis le mucus est redéposé sur la culture. Après 5 minutes d'attente le transport est observé au grossissement x40 ou x63, avec le puits posé sur une lame de verre optique (voir préparation de la boîte ci-dessus) et une acquisition à 60 images par seconde. Pour ces cultures, le transport n'a quasiment pas été acquis car la densité de cellules ciliées était trop basse pour permettre un transport. De plus, l'observation de l'activité ciliaire pour l'étude de la coordination ayant été faite séparément pour ne pas avoir de billes venant perturber l'analyse du battement ciliaire, et comme il n'y a pas de point de repère sur les épithéliums, la zone d'acquisition du transport peut être décalée de quelques dizaines voire centaines de micromètres de la zone d'acquisition de l'activité ciliaire. Sur ces cultures, le transport d'un fluide newtonien (solution tampon PBS) a également été mesuré. Les

billes de latex sont incorporées dans 100 μL de PBS, puis 50 μL de PBS sont déposés sur la culture après avoir retiré le mucus surnageant. Les conditions d'acquisitions sont les mêmes que pour le mucus.

Cultures PneumaCult. Le mucus de ces cultures étant très difficile à prélever (cf partie I.2.1) il n'est pas envisageable de mettre des billes directement dedans avec une répartition homogène, sans le diluer. Les cellules mortes et débris très présents dans le mucus de ces cultures servent donc de sondes pour une première acquisition lorsqu'il y en a en mouvement sur la zone. Puis les billes sont incorporées dans 100 μL de milieu nutritif dont 50 μL est déposé sur la culture pour une deuxième acquisition systématique du transport. Le transport est observé au grossissement $\times 40$ ou $\times 63$, avec le puits dans son boîtier de culture et une acquisition à 60 images par seconde dans le mucus pur et 125 ou 250 images par seconde avec l'ajout de 50 μL de milieu. Des acquisitions au grossissement $\times 10$ ou $\times 5$ ont été réalisées pour observer l'organisation du transport à l'échelle du puits. Sur ces cultures, le suivi de l'évolution de l'activité ciliaire et de transport au cours du temps a été effectué quasi quotidiennement. 3 acquisitions minimum correspondant à trois localisations différentes, dont le centre du puits, sont prises par jour au $\times 40$ ou $\times 63$ avec les 50 μL de milieu ajoutés.

II.2.1.4. Mode d'application des drogues et des fluides viscoélastiques

Drogues jouant sur la concentration en calcium Ca^{2+} . Afin d'observer l'influence du calcium sur l'activité ciliaire, deux drogues ont été testées : l'EGTA qui est une substance qui capte et piège le calcium environnant (capte les métaux de façon général) ; et le GSK-7975A qui bloque le canal Orai3 des cellules responsables de la régulation du calcium intracellulaire. Les acquisitions sur l'activité ciliaire (densité et fréquences) sont faites après 30 minute d'incubation des épithéliums, sur la face apicale seulement, dans 500 μL de PBS avec la concentration de drogue de 2mM et 10 μM pour respectivement l'EGTA et le GSK. Ces solutions de drogues ont été préalablement préparées à l'hôpital Arnaud de Villeneuve de Montpellier par Aurélie Petit. Une acquisition sans drogues, juste avec le PBS, sert de référence. Chaque drogue est appliquée sur un filtre différent du même patient. Toutes les expériences avec ces drogues ont été réalisées sur les cultures avec le milieu BEGM entre J20 et J34, avec minimum 3% de densité de cellules ciliées qui battent afin d'observer l'effet des drogues sur l'activité ciliaire. Cinq films correspondant à cinq régions différentes sur l'épithélium, sont pris par puits pour l'activité ciliaire avec le protocole expliqué ci-dessus (cf II.2.1.2) et les valeurs rapportées par patient sont la moyenne entre ces cinq acquisitions. La vitesse de transport n'est pas acquise pour cette expérience.

Le tabac. L'effet du tabac sur l'activité ciliaire a été testé grâce à de l'extrait de tabac, appelée CSE (Cigarette Smoke Extract en anglais). Cette substance est diluée dans du PBS avec une concentration finale de 5% et les épithéliums sont incubés 6 heures dans cette solution toutes les 48 heures sur la face apicale. Une incubation dans du PBS pur sert de référence. Pour un patient, du

lipopolysaccharide (LPS), le composé des membranes externes des bactéries gram négative, type *Escherichia coli*, est également ajouté pour observer la réaction de l'épithélium à une agression bactérienne. Le LPS est ajouté au PBS avec le CSE avec concentration de 1 µg/mL de LPS. Chaque solution est incubée sur un puits différent du même patient. Les solutions et les incubations ont été réalisées à l'hôpital Arnaud de Villeneuve de Montpellier par Engi Ahmed, Charlotte Vernisse et Aurélie Petit. Toutes les expériences avec le CSE ont été réalisées sur des cultures avec le milieu PneumaCult, sur des patients BPCO sévères (début des symptômes avant 45 ans et une perte de la capacité respiratoire ainsi qu'une destruction emphysémateuse de plus de 30%). L'observation est faite entre J28 et J40, le lendemain de la dernière incubation. Trois films minimum, correspondant à différentes localisations sur l'épithélium, sont pris par puits pour l'activité ciliaire et le transport, et les valeurs rapportées par patient sont la moyenne entre ces acquisitions, avec 50 µL de milieu ajouté. Le mode d'acquisition pour l'activité ciliaire et le transport est celui décrit ci-dessus (II.2.1.2 et II.2.1.3) avec exactement la même localisation entre l'activité ciliaire et le transport.

Fluides viscoélastiques. Différentes concentrations de mucus synthétiques (cf partie I.2.1) sont préparés en y dispersant les billes de latex. Sur un même puits, les acquisitions de l'activité ciliaire et du transport sont effectuées dans l'ordre : dans le mucus, puis dans 50 µL de milieu nutritif, puis dans 50 µL de mucus synthétique en allant de la concentration la plus faible à la plus concentrée (soit 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 % d'Actigum). Afin de retirer la couche de mucus initialement présente, la culture est incubée dans 50 µL de milieu durant une nuit avant le jour de l'expérience afin de faciliter le prélèvement et le retrait du mucus. Cette méthode de lavage du tissu pour retirer la couche de mucus ne nous assure pas son retrait complet, une part du mucus peut rester collée aux cellules. Pour s'assurer de décoller l'intégralité du mucus, on pourrait utiliser le protocole décrit dans la littérature (Matsui et al. 1998; Carpenter et al. 2018) mais il est très agressif pour l'épithélium et n'a donc pas été appliqué. Ce protocole consiste à incuber la culture avec un bain contenant de l'ATP pour forcer les cellules caliciformes à expulser toute leur réserve de mucus puis un bain au DTT pour casser le réseau du mucus et faciliter son lavage. Une fois le mucus retiré l'expérience avec un autre type de fluide ajouté sur le tissu peut commencer. Le filtre est rincé au PBS avant chaque ajout de mucus synthétique et un temps d'attente de 10 min minimum est respecté après le dépôt de chaque solution. Cette expérience a été réalisée uniquement sur des cultures avec le milieu PneumaCult entre J14 et J28, avec le protocole d'acquisition décrit ci-dessus pour ces cultures (II.2.1.2 et II.2.1.3). Un minimum de trois films, correspondant à trois régions différentes sur l'épithélium, sont pris pour chaque puits et fluides ajoutés.

II.2.2. Article 3 : Traitements des vidéos et analyses des trajectoires de battement

II.2.2.1. Présentation de l'article 3

L'imagerie et l'analyse des épithélia ciliés afin d'accéder au cycle de battement individuel de chaque cil afin d'étudier dans le détail la coordination spatiotemporelle du battement sont des challenges difficiles à réaliser. La majorité des études sur ces épithélia choisissent une approche plus globale en étudiant l'orientation des battements des cellules et en détectant et mesurant les paramètres des ondes métachronale générées. Une analyse fine des différents paramètres spatiotemporels de chaque cil ou petit groupe de cils, sur une large zone spatiale ($300 \times 300 \mu\text{m}^2$), manque toujours afin de quantifier la coordination ciliaire de l'échelle de la cellule à celles d'une centaine de cellules.

Les principaux apports de cet article sont :

- Une analyse du battement ciliaire à l'échelle locale des sous-groupes de cils au sein des cellules ciliées, et ce sur une région spatiale de plus de $200 \mu\text{m}^2$.
- L'accès à de nombreux paramètres de battement tels que : la fréquence, la phase, la position, l'orientation, l'excentricité et dans une moindre mesure l'amplitude ; et l'évolution de ces paramètres au cours du temps.
- La possibilité de l'étude de la coordination spatiotemporelle des cils, même sans ondes métachronales apparentes, grâce à des fonctions de corrélation avec les trajectoires brutes et/ou avec les paramètres obtenus.
- L'application d'une fonction de groupement ('clustering') par densité, permet d'identifier des groupes de trajectoires à l'échelle de la cellule ciliée. Ainsi l'étude de la coordination spatiotemporelle peut se faire à l'échelle de la cellule afin d'analyser les différents mécanismes de battement en leur sein.

II.2.2.2. Article 3 :

Image processing method for cilia tracking and quantification of cilia spatiotemporal coordination.

M. Jory¹, L. Casanellas¹, I. Vachier², A. Bourdin^{2,3}, G. Massiera¹

1 Université de Montpellier, Laboratoire Charles Coulomb, CNRS UMR 5221, Montpellier, France

2 PhyMedExp, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Montpellier, France

3 Department of Pneumology and Addictology, Montpellier University Hospital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France

Abstract

Investigating the functioning of ciliated epithelia is a biomedical issue. An original method to analyse multi ciliated systems and study their spatiotemporal coordination, from optical microscopy images, is presented here. Our method relies on the tracking of each cilium, and on the spatial and temporal analysis of cilia trajectories to measure several key physical parameters such as the position, frequency, phase and beating orientation. The spatiotemporal coordination can be quantified both, within a single cell or in-between ciliated cells to quantify the level of coordination at different length scales. In addition, mapping of the physical parameters allows us to evaluate the cilia activity and spatial organization.

Introduction

In living systems, many microorganisms have flagella to move within a fluid. In more complex organisms, some epithelia, such as the airways epithelia of mammals, have ciliated cells to

transport a fluid. These flagella or cilia have to be coordinated to succeed in their function. Developing new methods to study and quantify this coordination at the scale of a single cell up to the epithelium scale, is fundamental to understand how coordination takes place and to identify the cause of dysfunctions in the case of pathologies.

For microorganisms, the flagella coordination was already well studied and understood. It is based on hydrodynamical coupling (Brumley *et al.*, 2014), dissipation of viscous forces by microswimmer rocking (Geyer *et al.*, 2013) and basal coupling within the cell (Wan and Goldstein, 2016). For ciliated epithelia, the mechanisms of cilia coordination at large scale is not yet understood. Several models of cilia immersed in purely viscous fluids show that cilia coordination at large scale occurs via hydrodynamical coupling with the emergence of a metachronal wave (Blake, 1973; Gueron *et al.*, 1997; Lagomarsino, Jona and Bassetti, 2003; Mitran, 2007; Kotar *et al.*, 2010; Di Leonardo *et al.*, 2012; Bruot and Cicuta, 2013; Elgeti and Gompper, 2013; Guo *et al.*, 2014; Siddiqui, Farooq and Rana, 2015; Hamilton and Cicuta, 2018; Hanasoge, Hesketh and Alexeev, 2018). Only a few models describe cilia beating in a viscoelastic fluid such as mucus (Chateau *et al.*, 2017), and a few take into account the heterogeneous spatial distribution of ciliated cells and its importance on the coordination mechanism (Dey, Massiera and Pitard, 2018; Juan *et al.*, 2019).

Experimental studies on ciliated epithelia show the emergence of a metachronal wave of short wave length, at the scale of one ciliated cell (Eshel and Priel, 1987; Gheber and Priel, 1989; Feriani *et al.*, 2017). Coordination can occur that may allow fluid transport, even with such a short metachronal wave length (Puchelle and Zahm, 1984; Puchelle, Zahm and Quemada, 1987; Matsui *et al.*, 1998; Sawamoto *et al.*, 2006; Faubel *et al.*, 2016; Khelloufi *et al.*, 2018).

It is a technical challenge, experimentally on epithelia, to be able to access the spatial repartition of several physical parameters such as the frequency, the beating orientation, the amplitude, the cilia density and the cilia pattern, and finally the cilia coordination. However, it is a main

medical issue to understand the mechanism of the mucociliary function and its functioning or dysfunctioning in the case of pathologies, in response to drugs, or for various mucus viscoelastic characteristics. Several experimental studies show original methods to analyse ciliated epithelia. The Micro-Optical Coherence Tomography (μ OCT) is used ex and in vivo to image the epithelium and measure its thickness, the mucus and periciliary layer (PCL) thickness, the mucus velocity and the detail of the cilia beating dynamics (Liu *et al.*, 2013; Chu *et al.*, 2016). The μ OCT is a powerful tool to investigate dysfunctions and pathologies of the epithelium. Using two optical fibers to detect pairs of cilia motion at different location on the epithelium, correlation functions have been computed between cilia in order to study the coordination at several length scales (Eshel, Grossman and Priel, 1985; Eshel and Priel, 1987; Gheber and Priel, 1989) on a small spatial area of about 100 μm of length maximum. The Multiscale Differential Dynamic microscopy (DDM) (Cerbino and Vailati, 2009; Giavazzi and Cerbino, 2014) is used to compute the beating frequency and measure the metachronal wave length and orientation on a large spatial zone (Feriani *et al.*, 2017). Nevertheless, the DDM method does not provide individual cilia information and thus does not allow the study of the coordination at the scale of a ciliated cell and is rather focused on the characterization of metachronal waves.

This article describes a new method to study multi-ciliated epithelia from optical microscopy videos on a large zone of about 300 per 300 μm^2 with individual spatiotemporal information on each cilium. Correlation functions of cilia motion can be computed in order to investigate coordination at several length scales and could eventually enable the understanding of the role of spatial heterogeneity.

Epithelial samples and videomicroscopy acquisition

Human bronchial epithelium. We use a model of human bronchial epithelium, reconstituted *in vitro* at the Air-Liquid Interface (ALI) (Jeffery, Holgate and Wenzel, 2003) with a protocol adapted from Gras et al. (Gras *et al.*, 2012) and Gamez et al. (Gamez *et al.*, 2015). Primary human bronchial epithelial cells are obtained from bronchial biopsies of patients, collected during fiberoptic bronchoscopy on a subsegmental bronchus of the *left lower lobe*, at *Arnaud de Villeneuve* hospital (Montpellier, France). All donors signed a consent form after being informed about the biomedical research on airway epithelium performed thanks to their donation. The protocol was approved by the institutional ethics commission of the of Sud Méditerranée III (CHRU Montpellier-AOI9244–NCT02354677). Briefly, two to three bronchial epithelial biopsies were mechanically dissociated and suspended in bronchial epithelial growth medium (BEGM) (Lonza). After an expansion phase in monolayers around 3 weeks, cells were plated on uncoated nucleopore membranes (24-mm dia., 0.4-mm pore size, Transwell Clear, Costar) in a 1:1 mixture of BEGM and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza) applied only at the basal side to establish the ALI and to model *in vivo* conditions and thus allow the differentiation. Cilia beating is observed usually from day 14 of the ALI phase, but 28 days are required to obtain a fully polarized and differentiated cell population (basal, Club, goblet and ciliated cells) with a mucociliary phenotype.

Imaging. We use an inverted optical microscope in bright field (Leica DMI 3000 B), equipped with a long working distance (2.6 mm) x63 objective, a 0.7 numerical aperture (NA) condenser, and with a high speed camera (Photron Fastcam PCI 1024). Videos are recorded at 500 fps in full resolution (1024 x 1024 pix²), and frames are saved as 8-bit images. The frame rate is chosen in order to have a detectable displacement in between two successive frames and in order to have enough frames within a beating cycle. The pixel to micron conversion results in a value of 0.274 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. The total duration of the film is 3s (given the 2Go camera memory). The epithelium culture is placed inside a stage chamber from Okolab, maintaining culture

conditions: 37°C and 5% of CO₂. The microscope light passes through successively the porous membrane, various cells constituting the epithelial tissue and a mucus layer. All these structures scatter the light and makes high resolution imaging difficult. In addition, the geometry of ALI cultures implies a distance between the objective and the epithelium which hinder high resolution imaging. To improve the images quality, we place the culture membrane supporting the epithelium directly on a sterilized cover slide, on top of a culture medium droplet. In addition, for each movie, the condenser aperture is optimized to decrease the field depth while maintaining a correct contrast value. A lot of care should be invested in the imaging as the determination of each cilium trajectory is highly dependent on it. The small depth of field of our objective limits the focus plan depth that is smaller than the cilia length. We choose to focus on cilia head to maximise the contrast between cilia and the tissue. A contrast around 50 minimum between the background and the identified cilia, on our 8 bit images with luminosity scaled from 0 to 255, is typically used.

Obtaining the trajectories

Routines have been written in Python using the 3.7 version installed with the Anaconda3 package.

Image processing. The optical resolution does not allow to distinguish the individual head of each cilium. Instead, small groups of cilia, that we will call beating particles (BPs) in the following, are the objects we tracked. On raw images (Fig.1A), BPs are hardly recognizable due to objects with similar intensity profiles (cell borders, membrane pores, non-moving cilia, ...) present on the light path. To get rid of these static objects, a background image is computed by averaging over all the frames of the whole movie (3s) and is next subtracted to each frame (Fig.1B). To favor an accurate location of the particles, a band pass filter is applied (Fig.1C).

The lower bandpass value (short wave length filtering) is set to 1 pixel, to filter noise coming from the optics and from the camera. The higher bandpass value (long wavelength filtering) is chosen close to the particle size in pixel, to smooth its intensity profile towards a Gaussian-like profile, which is detected with a better accuracy by the locate routine from trackpy. This parameter is optimized for each movie but is often chosen close to 5 pixels for the optical configuration we used. The filtered image is then rescaled to have pixel intensity in between 0 and 255.

Cilia locating and tracking. The *trackpy* library, version 0.3.2 (Allan *et al.*, 2016), includes an object locating routine called 'locate' and a tracking routine called 'link_df'. The locating routine is an implementation of the Crocker-Grier centroid-finding algorithm (Crocker and Grier, 1996) and is based on a KDTree algorithm, which selects among objects nearby the previous location of the nearest-neighbour (Bentley, 1975; Maneewongvatana and Mount, 1999).

We use the routine 'locate' to detect the particle positions (Fig.1D). 'Locate' has two input parameters: the particle minimum size and the integrated intensity threshold ('minmass'). The 'locate' parameters which are optimized for each movie can vary with the optical quality, the particle size and the contrast between the particle and the background. In most cases, a size of 7 and a 'minmass' of 0 are selected for our experiments. As illustrated in Fig.1D, we set the 'minmass' value in order to obtain slightly larger number of locations than particles. It is preferable to avoid particle loss, since false particles can be eliminated in further steps of the method, based on different criteria.

Two main parameters have to be set for the link_df tracking routine: the maximum distance r (in pixels) travelled by the objects in between two consecutive frames; and the memory (in number of frames), which sets for how long the particle can be lost. The distance parameter r should be chosen with care. It must be lower than the typical distance between two particles

(around 3-8 pixels) to avoid to confuse several adjacent particles, and about 2 times larger than the typical distance travelled by a cilium in between two frames. We use typically a value of 3 pixels. The memory value is set to $3/4$ of the guessed beating period (estimated by our observations during the video acquisition), in order to take into account the recovery stroke phase of the cilium during which cilia are out of focus. With a guess frequency of 10 Hz and a frame rate of 500 fps a value of 37 frames is selected.

Trajectories merging and sorting. An example of the results obtained using the tracking procedure is shown in Fig.4A. Despite using a large memory value, the length of the obtained trajectories is short (< 150 frames) and the number of BPs obtained is about 15 times larger than the estimated number (Fig.4A). Some trajectories partially overlap indicating that they may correspond to the same beating particle and thus they need to be merged. The data processing method, based on a series of successive sorting and merging steps, is described in Fig.3A. First, very short trajectories with less than three frames are excluded, and only trajectories corresponding to bright particles are selected. To this purpose, the total brightness (the intensity integrated over the BP area) is averaged over all the frames of the trajectory and is called mean-mass in the following. The mean-mass is computed for each trajectory and the value of the highest peak (called MMP in the following) of the mean-mass distribution over all of the trajectories is determined and used as a criterion for trajectories sorting. Trajectories with an average mean-mass lower than $1.3 * MMP$ are excluded. Then, two successive merging steps (based on the degree of overlap) and sorting steps are performed on the trajectories (Fig.3). Merging relevance is evaluated on the degree of overlap quantified by an overlapping parameter (OP). Before computing OP, we cluster trajectories whose relative distance is small, lower than the distance between two neighbouring cilia. An ensemble of trajectories is identified by using a clustering 'meanshift' routine, based on the vicinity of the particles within a maximal distance

to the cluster center, named 'bandwidth'. The clustering is performed on the barycentre coordinates of the trajectories. For the first step of merging and sorting, the 'bandwidth' is fixed at $0.8 \mu\text{m}$ (3 px). In each ensemble, and for each trajectory, an image is created with pixel values equal to 0 except for pixels belonging to the trajectory (pixel value equal to 1). For each trajectories pair, the two images are added and the overlap is quantified by computing an overlap parameter (OP) defined as the number of pixel equal to 2 on the summed image (which correspond to pixels where trajectories overlap) over the number of pixel equal to 1 on the image corresponding to the shortest trajectory (Fig.3B). The OP is computed for every pair of cilia within each ensemble and trajectories are merged if the OP is larger than an empirically optimized value of $OP_{\text{max}}=3/5$. In the first step of merging/sorting, we choose a strong criterion to prevent merging of adjacent BPs. Then among merged trajectories, we only consider trajectories with a variance in the interval 0.4 to $2 \mu\text{m}^2$ (trajectories extending on length scale comparable to the cilia beating amplitude) and with a number of points (temporal length in frames) smaller than $1/50$ of the video duration to get rid of very short trajectories. On some occasions, we obtained a double location of the same particle identity and frame that may happen during the merging step. We systematically exclude data corresponding to multiple occurrences. After merging we assign new identity numbers to the new trajectories in order to have a continuous numeration. Finally, a second step of merging/sorting is applied, using a larger clustering bandwidth of $1.4 \mu\text{m}$, an OP_{max} value of $1/2$, and a minimum trajectory length of $1/10$ of the video duration. All of the merging and sorting parameters for the two steps can be optimized for each video. In Fig.4, trajectories before and after the merging/sorting processing of the data are shown.

Final trajectories can contain errors (Fig.4B): merging of two trajectories corresponding to different BPs can occasionally occur, as well as the non-merging of trajectories from the same particle. Moreover, the object localisation of a group of cilia and not a single cilium can be an

error source during the tracking with a jump between very close particles if these cilia are not synchronous and do not stay clustered over time. Nevertheless, we obtain on average 15 trajectories per cell after data processing, which is close to the estimated number of BPs. We estimate to 5% the percentage of error on the final trajectories due to the merging/sorting process.

Cilia density and beating frequency

As a first step, a brief analysis is performed to quantify the surface density of cells with beating cilia and the cilia beating frequency. These two quantities can easily and rapidly be determined as they do not require the previous determination of cilia trajectories. They provide information on cilia activity that can be useful for biological studies in order to compare different epithelia and the impact of drugs.

To measure the surface density of ciliated cells, we first compute the average of the bandpass filtered images (images with the background subtracted) over the whole sequence. This image corresponds to a time projection of the particle trajectories and minimizes the contribution of immobile objects. An intensity threshold applied on this image allow us to enlightening the cilia positions over time, thus producing a map of the motile cilia localization. The surface density is taken as the ratio of the number of pixels with an intensity above the threshold over the total number of pixels. The choice of the threshold should be optimized for each movie. Fig.2A illustrates a map of beating cilia obtained using two extrema for the threshold values. These two threshold values are used to compute the surface density (mean of the two densities determined with the two thresholds) and to estimate the error on its determination (deviation between the mean and the maximum).

The periodic variation in intensity of pixels located on the path of beating particles is used to infer the beating frequency. These pixels of interest are first selected using the same locate function as described in the trajectories section, but using a large min-mass parameter in order to restrict the located objects to those having the highest probability of belonging to a cilia trajectory (Fig.2B). For each of these pixels, the dominant frequency is inferred from the power spectrum of the intensity time variation. The histogram of the frequencies obtained on all the pixels is fitted by a Gaussian distribution to determine the mean beating frequency and its standard deviation (Fig.2C).

Analysis of cilia trajectories

Fig. 5A shows a typical BP trajectory over 2s. The time dependence of the BP position is shown in Fig.5B and C for two different BPs, illustrating the fact that the sampling rate is irregular, considerably lower than the acquisition frame rate and that it can be very different from one BP to another. We indeed track the projection of groups of cilia tips in the horizontal focal plane of the microscope. During a cycle the BP can exit from the focal plane and be missing for several frames, up to $3/5$ of a cycle. We consequently have partial time course data at our disposal for correlation analysis. In a first approach, and to avoid performing statistical analysis on partially inferred data, we use partial data and combine the spatial and temporal analysis to infer, for each of the BPs, several parameters which characterize the position and shape of the trajectory, and the periodicity parameters on the whole recording duration. Statistical analysis and mapping can then be performed on these parameters at different length scales. We thus neglect in this approach any time variation of the beating frequency and of possibly existing interactions between the BPs that could cause these parameters to vary in time. In a second approach, we consider, in our analysis of the trajectories, evolution of the beating in time.

Depending on the percentage of missing data, we use two different methods to infer and analyse these time variations.

BP trajectory shape and periodic characteristics – Several spatial parameters characterize the individual trajectory of each cilium: we can infer the beating centre $C(c_x, c_y)$, the beating orientation θ , the beating amplitude A , and the trajectory eccentricity Ecc , which differs depending on the beating pattern, straight or circular. The beating particles phase φ and frequency f can also be considered as periodicity parameters.

The trajectory barycentre differs from the beating centre because of the asymmetry in velocity of the cilia beating (Fig.5A and B) and because the BPs can be missing during an important fraction of a cycle (Fig.5C). Our strategy is to fit the BPs position $x(t), y(t)$ with a sinusoidal function as:

$$x(t) = A_x \cos(2\pi f t + \varphi_x) + c_x$$

$$y(t) = A_y \cos(2\pi f t + \varphi_y) + c_y$$

, with seven fitting parameters: the amplitude (A_x, A_y) , the beating frequency f , the phase $\varphi(\varphi_x, \varphi_y)$ and the beating centre $C(c_x, c_y)$. Due to missing data and irregular sampling, the guess parameters values are crucial for a successful fit. For $C(c_x, c_y)$, we use the trajectory barycentre $B(b_x, b_y)$ and an arbitrary value of 0.1 is used for the phase $\varphi(\varphi_x, \varphi_y)$. $A(A_x, A_y)$ guess parameters are taken as half of the maximum deviation in respectively x and y values. The frequency guess parameter is the most important and should approach the estimated value within less than 2 Hz. The frequency guess is inferred from the power spectrum of the intensity time variation computed on the barycentre pixel. This first fitting step allows us also to apply an additional sorting of the trajectories depending on the quality of the fit quantified by the χ^2 fit parameter. Bps trajectories fitted with a lower χ^2 than 0.003 are excluded from the following analysis. From this first fitting analysis, we use the beating centre $C(c_x, c_y)$ together with the

beating orientation θ determined from the inertia matrix (Fig.5A), to rotate the coordinate system around C by an angle $-\theta$ (in such a way that the X axis gets aligned with the beating axis and centred on (0,0), and the Y axis becomes perpendicular to it. Finally, the trajectory $X(t)$ and $Y(t)$ are fitted with a sinusoidal function to determine the final parameters A , f and φ (Fig5.B and C). The guess parameters are the frequency obtained from the $x(t), y(t)$ fit, 0.1 for the phase and $(X_{max} - X_{min})/2$ for the amplitude. The eccentricity is computed with $Ecc = A_Y/A_X$. Bps trajectories fitted with a higher χ^2 than 5 on $Y(t)$ (dominated by the noise on straight trajectories with Ecc close to 0) are excluded from Ecc determination.

The different values obtained for these parameters can be represented in histograms (Fig.6) and mapped into spatial localization (Fig.9) in order to characterize the ciliary activity of the epithelium and describe their spatial and probabilistic distribution. Fig.6A illustrates the distribution of frequencies on a small area of the epithelium (0.1 mm^2), which typically varies from 5.5 to 10.5 Hz. The beating orientation can be mapped on this same small area of 0.1 mm^2 (Fig.6B) showing a global orientation, which could eventually be compared to the mucus velocity field. We also observe that the beating amplitude is of about $1 \mu\text{m}$ (Fig.6C) and that most of the trajectories are straight, with an eccentricity close to 0.2. In some occasions, circular trajectories with $Ecc > 0.6$ are also obtained (Fig.6D). These parameters can be useful to quantify the ciliary activity under several conditions (drugs, mucus properties, ...) but also to compute spatiotemporal correlation functions and evaluate the level of coordination between cilia and ciliated cells.

Temporal variation of the beating parameters - Cilia are not fixed oscillators, their amplitudes, phases, and frequencies can change over time. In the following, we consider time variation of the beating parameters to perform time correlation analysis. Two methods are proposed depending on the amount of missing data (which may vary from several frames up to 3/5 of a cycle). When missing data represents less than a 2/3 of the trajectory, we compute time

correlation functions between pairs of cilia and evaluate their degree of correlation in beating. In the reverse case, we use a sliding-fit method.

Time correlation function with raw trajectory - The temporal correlation function $F_c(\tau)$ between two beating particles 1 and 2 reports the level of correlation between two time signals shifted by a given lagtime τ , and writes:

$$F_c(\tau) = \frac{\langle X_1(t) X_2(t + \tau) \rangle}{\sqrt{\langle X_1(t)^2 \rangle \langle X_2(t + \tau)^2 \rangle}}$$

, where $X_1(t)$ and $X_2(t)$ are the X coordinates at a time t of BP 1 and 2 respectively, in their respective beating referential. To compute $F_c(\tau)$, we only consider trajectories with less than 2/3 of missing data. Nevertheless, since data are not missing at the same frames, we evaluate, for each lagtime τ , the number N of matches between the two shifted signals. The relative error of F_c is determined as $1/\sqrt{N}$. This method is used only when N is larger than 15. For lower values of N the relative error on $F_c(\tau)$ is large (>25 %) and these pairs are thus excluded.

Since BPs signals are periodic for the two cilia, and typically with very close frequencies, the function $F_c(\tau)$ that we obtain is periodic with the same periodicity as the beating (Fig.8A). The level of coordination for a given couple of BPs is characterized by C_{max} , the value of the maximum correlation. The lagtime τ_{max} at which $F_c(\tau_{max}) = C_{max}$ is measured to compute the phase shift $\Delta\phi$ between the two BPs as $\Delta\phi = 2\pi\tau_c\omega_c$, with ω_c the beating frequency of the cilia pair (Fig.8A). The distribution of $\Delta\phi$ computed over all cilia pairs within a ciliated cell is large and it is illustrated in Fig.8B.

Sliding fit – When the percentage of missing data increases and that the number N of matches per couple is too small (<15), correlation functions are not reliable and cannot be used anymore. Instead, we use a sliding window fitting to correctly measure time variation of the beating parameters. For each BP, the position $X(t)$ in the beating referential is fitted with a sinusoidal

fit,

$X(t) = A \cos(2\pi f t + \varphi)$, on a window of width equal to three beating cycles and which is time shifted by 2 frames, which corresponds to 1/32 of a cycle. This approach allows us to infer the variation of the fitting parameters in time with a constant sampling of 2 frames. If we keep A , f and φ as free parameters, we obtain that the frequency varies over time on a range of 0.5 Hz on the 3s duration of the video recording. The phase and the frequency fitting parameters are highly dependent in the fitting procedures. This makes difficult to infer any time variation by having both f and φ as free parameters. Since the frequency varies only slightly, we choose to fix the frequency and use only two free parameters, A and φ . We checked the impact of the fixed frequency value on the phase variation of a single BP and on the phase shift between two BPs, using three different values of f (the fitting parameter f inferred from the global fit, or the maximum and minimum frequencies over time obtained using the three free parameters). Phase variations differ depending on the frequency fixed value, with up to 0.4 rad deviation. Nevertheless, the phase difference between two BPs is not dependent on the value chosen for the frequency. Moreover, if we consider all the sliding fit, the fit success is higher with the global fit frequency fixed. For sliding fits, we thus fixed the frequency of the sinusoidal fit to the one obtained by fitting on the whole recording duration.

The phase time course obtained with sliding window fitting can be used to compute spatiotemporal correlation functions and phase instantaneous values can be mapped to show evidence for beating patterns inside a single ciliated cell or for metachronal wave at larger length scales (Fig.9C).

Coordination of intra cilia cells

Clustering. BPs clustering allows us to identify to which cell each BP belongs to, and to analyse and understand the coordination inside single cells. A mean shift algorithm from the Scikit-learn library (Pedregosa *et al.*, 2011) in Python is applied on the trajectories barycentres of the BPs clusters. Briefly, this algorithm looks for kernels that correspond to maxima of a density function (flat kernel) for an estimated area of radius a (Fukunaga and Hostetler, 1975). Points that converge to the same local maxima are considered as a cluster. As guess parameter a , called bandwidth, we choose the mean distance between the particles inside a ciliated cell, which is approximately 25 pixels ($\sim 6 \mu\text{m}$). However, the spatial parameter is often not sufficient to differentiate adjacent ciliated cells. Therefore, based on the fact that BPs from the same cell have a narrow frequency distribution (standard deviation $< 0.5 \text{ Hz}$), we use BPs frequencies as a third dimension for the mean shift clustering, with a weighing factor to give equal emphasis to distances and frequency differences, which results in an increased efficiency of the clustering process (Fig.7). Still some clustering errors persist, for instance when cilia from adjacent cells beat at close frequencies.

The study of the cilia coordination inside a given cluster allows us to observe several beating organizations within the ciliated cells. First, two main groups can be detected: straight (which represent the majority of them) and circular trajectories. In the straight group, three beating subgroups can be identified: synchronous beating (with a small phase shift), and beating in phase opposition. We can map these beating families and quantify the proportion of each group. These representations and the standard deviation of parameters, such as the frequency and the orientation inside a ciliated cell, show a high degree of liberty within a single cell that could explain how cilia beating may adapt to various conditions (mucus viscoelasticity, layer thickness, ...) in order to maintain coordination and mucus transport.

Discussion

Limitations of the procedure - High density of cilia is problematic for clustering and thus for ciliated cell identification. For adjacent ciliated cells with similar beating frequency, it is not possible with this method to determine the border between ciliated cells and such that the clustering is unreliable, hindering the coordination analysis at the single cell level. Moreover, the duration of the procedure depends on the number of trajectories to be analysed. For example, it takes more than 24h for an area of about $80\,000\ \mu\text{m}^2$ with a cilia density larger than 50%. Memory issues can occur with high density epithelium, and in these situations the analysis has to be performed on smaller areas. Finally, the determination of the eccentricity and amplitude is sometimes not accurate enough and can be underestimated due to the fact that some trajectories are truncated.

Potential of the process - However, this original process based on the tracking of small packs of cilia (<10 cilia) and the subsequent temporal and spatial analysis of the obtained trajectories, allows us to access to 6 parameters for each particle: the frequency, the phase, the position, the orientation, and to a lesser extent the eccentricity and the amplitude. All these parameters can be mapped to observe the distribution and heterogeneity of the cilia beating and more generally to characterize the cilia activity. For example, we representing the frequency distribution (Fig.8A), we can show that i) frequencies range from 5.5 to 10.5 Hz on the $0.1\ \text{mm}^2$ region of the epithelium, ii) it exists up to 2 Hz variation from cell to cell even for adjacent ones, and iii) a significant standard deviation (0.5 Hz) for the frequency has been observed within a single cell. The beating orientation (Fig.8B) displays a coherent global orientation with a high standard deviation (30° on average) of the beating angle within a single cell. Many correlation functions can also be computed thanks to these parameters in order to study the coordination at several length scales and time scales, even without the existence of a metachronal wave. For example, the clustering of ciliated cell allows us to study the temporal coordination inside single cells and observe different beating patterns: global synchrony, with two or three subgroups of cilia

in phase shift or in phase opposition, no temporal correlation (ciliated cell disorganized). Finally, the approach with a sliding fit enables to access the time variation of the cilia spatiotemporal parameters and take them into account in the computation of the correlation functions.

Conclusion

This original process provides new tools to study the spatiotemporal coordination (even in situations for which the coordination is less obvious than metachronal waves), and to analyse and quantify the heterogeneity of the cilia activity. We can identify several beating patterns inside cells and we can observe the number and the repartition of each pattern on the tissue and their evolution over time. Finally, this quantitative characterization of cilia activity and level of coordination can be used to compare different epithelia and to allow a better understanding of the impact of the environment and conditions (mucus properties, drugs, tissue aggression, ...) on the cilia beating efficiency for mucus transport.

Author contributions

IV, AB, and GM conceived the project. MJ, LC, IV, AB, and GM coordinated the program development and the data analysis. AB team provided cultures. MJ performed video microscopy experiments, developed the program, analyzed data and wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

Acknowledgments

Funding: ESR, Vaincrelamuco, Labex Numev, ANR Mucocil.

References

- Allan, D., Caswell, T., Keim, N. and van der Wel, C. (2016) 'trackpy: Trackpy v0.3.2'. Zenodo. doi: 10.5281/zenodo.60550.
- Bentley, J. L. (1975) 'Multidimensional Binary Search Trees Used for Associative Searching', *Communications of the ACM*, 18(9), pp. 509–517. doi: 10.1145/361002.361007.
- Blake, J. (1973) 'Flow in tubules due to ciliary activity', *Bulletin of Mathematical Biology*, 35, pp. 513–523.
- Brumley, D. R., Wan, K. Y., Polin, M. and Goldstein, R. E. (2014) 'Flagellar synchronization through direct hydrodynamic interactions', *eLife*, 2014(3), pp. 1–15. doi: 10.7554/eLife.02750.001.
- Bruot, N. and Cicuta, P. (2013) 'Emergence of polar order and cooperativity in hydrodynamically coupled model cilia', *Journal of the Royal Society Interface*, 10(87). doi: 10.1098/rsif.2013.0571.
- Cerbino, R. and Vailati, A. (2009) 'Near-field scattering techniques: Novel instrumentation and results from time and spatially resolved investigations of soft matter systems', *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. Elsevier Ltd, 14(6), pp. 416–425. doi: 10.1016/j.cocis.2009.07.003.
- Chateau, S., Poncet, S., Favier, J. and Ortona, U. D. (2017) 'Metachronal waves formation in 3D cilia arrays immersed in a two-phase flow Résumé : Abstract ', *Conference paper '23ème Congrès Français de Mécanique', 28-1 Septembre 2017, Lille (France)*.
- Chu, K. K., Unglert, C., Ford, T. N., Cui, D., Carruth, R. W., Singh, K., Liu, L., Birket, S. E., Solomon, G. M., Rowe, S. M. and Tearney, G. J. (2016) 'In vivo imaging of airway cilia and mucus clearance with micro-optical coherence tomography', *Biomedical Optics Express*, 7(7), p. 2494. doi: 10.1364/BOE.7.002494.
- Crocker, J. C. and Grier, D. G. (1996) 'Methods of digital video microscopy for colloidal studies', *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(1), pp. 298–310. doi: 10.1006/jcis.1996.0217.
- Dey, S., Massiera, G. and Pitard, E. (2018) 'Role of spatial heterogeneity in the collective dynamics of cilia beating in a minimal one-dimensional model', *Physical Review E*. American Physical Society, 97(1). doi: 10.1103/PhysRevE.97.012403.
- Elgeti, J. and Gompper, G. (2013) 'Emergence of metachronal waves in cilia arrays', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(12), pp. 4470–4475. doi: 10.1073/pnas.1218869110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1218869110.
- Eshel, D., Grossman, Y. and Priel, Z. (1985) 'Spectral characterization of ciliary beating: variations of frequency with time', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 249(1), pp. C160–C165. doi: 10.1152/ajpcell.1985.249.1.c160.

- Eshel, D. and Priel, Z. (1987) 'Characterization of metachronal wave of beating cilia on frog's palate epithelium in tissue culture', *Journal of Physiology*, 388, pp. 1–8.
- Faubel, R., Westendorf, C., Bodenschatz, E. and Eichele, G. (2016) 'Cilia-based flow network in the brain ventricles', *Science*, 353(6295), pp. 176–178. doi: 10.1126/science.aae0450.
- Feriani, L., Juenet, M., Fowler, C. J., Bruot, N., Chioccioli, M., Holland, S. M., Bryant, C. E. and Cicuta, P. (2017) 'Assessing the Collective Dynamics of Motile Cilia in Cultures of Human Airway Cells by Multiscale DDM', *Biophysical Journal*. Biophysical Society, 113(1), pp. 109–119. doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.028.
- Fukunaga, K. and Hostetler, L. D. (1975) 'The Estimation of the Gradient of a Density Function, with Applications in Pattern Recognition', *IEEE Transactions on Information Theory*, 21(1), pp. 32–40. doi: 10.1109/TIT.1975.1055330.
- Gamez, A. S., Gras, D., Petit, A., Knabe, L., Molinari, N., Vachier, I., Chanez, P. and Bourdin, A. (2015) 'Supplementing defect in club cell secretory protein attenuates airway inflammation in COPD', *Chest*, 147(6), pp. 1467–1476. doi: 10.1378/chest.14-1174.
- Geyer, V. F., Jülicher, F., Howard, J. and Friedrich, B. M. (2013) 'Cell-body rocking is a dominant mechanism for flagellar synchronization in a swimming alga', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), pp. 18058–18063. doi: 10.1073/pnas.1300895110.
- Gheber, L. and Priel, Z. (1989) 'Synchronization between beating cilia', *Biophysical Journal*, 55(1), pp. 183–191. doi: 10.1016/S0006-3495(89)82790-0.
- Giavazzi, F. and Cerbino, R. (2014) 'Digital Fourier microscopy for soft matter dynamics', *Journal of Optics (United Kingdom)*. IOP Publishing, 16(8). doi: 10.1088/2040-8978/16/8/083001.
- Gras, D., Bourdin, A., Vachier, I., De Senneville, L., Bonnans, C. and Chanez, P. (2012) 'An ex vivo model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Ltd, 129(5), p. 1259–1266.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.073.
- Gueron, S., Levit-Gurevich, K., Liron, N. and Blum, J. J. (1997) 'Cilia internal mechanism and metachronal coordination as the result of hydrodynamical coupling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp. 6001–6006. doi: 10.1073/pnas.94.12.6001.
- Guo, H., Nawroth, J., Ding, Y. and Kanso, E. (2014) 'Cilia beating patterns are not hydrodynamically optimal', *Physics of Fluids*, 26(9), pp. 1–12. doi: 10.1063/1.489485.
- Hamilton, E. and Cicuta, P. (2018) 'Interpreting the synchronisation of driven colloidal oscillators via the mean pair interaction', *New Journal of Physics*. IOP Publishing, 20(9), p. 93028. doi: 10.1088/1367-2630/aae103.
- Hanasoge, S., Hesketh, P. J. and Alexeev, A. (2018) 'Metachronal motion of artificial magnetic cilia', *Soft Matter*. Royal Society of Chemistry, 14(19), pp. 3689–3693. doi: 10.1039/c8sm00549d.
- Jeffery, P., Holgate, S. and Wenzel, S. (2003) 'Methods for the Assessment of Endobronchial Biopsies in Clinical Research', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(supplement_1), pp. S1–S17. doi: 10.1164/rccm.200202-150ws.

- Juan, G. R. R., Mathijssen, A. J. T. M., He, M., Jan, L., Marshall, W. and Prakash, M. (2019) 'Multi-scale spatial heterogeneity enhances particle clearance in airway ciliary arrays', *bioRxiv*, pp. 1–19. doi: 10.1101/665125.
- Khelloufi, M. K., Loiseau, E., Jaeger, M., Molinari, N., Chanez, P., Gras, D. and Viallat, A. (2018) 'Spatiotemporal organization of cilia drives multiscale mucus swirls in model human bronchial epithelium', *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-20882-4.
- Kotar, J., Leoni, M., Bassetti, B., Lagomarsino, M. C. and Cicuta, P. (2010) 'Hydrodynamic synchronization of colloidal oscillators', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), pp. 7669–7673. doi: 10.1073/pnas.0912455107.
- Lagomarsino, M. C., Jona, P. and Bassetti, B. (2003) 'Metachronal waves for deterministic switching two-state oscillators with hydrodynamic interaction', *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 68(2), p. 9. doi: 10.1103/PhysRevE.68.021908.
- Di Leonardo, R., Búzás, A., Kelemen, L., Vizsnyiczai, G., Oroszi, L. and Ormos, P. (2012) 'Hydrodynamic synchronization of light driven microrotors', *Physical Review Letters*, 109(3), pp. 1–5. doi: 10.1103/PhysRevLett.109.034104.
- Liu, L., Chu, K. K., Houser, G. H., Diephuis, B. J., Li, Y., Wilsterman, E. J., Shastry, S., Dierksen, G., Birket, S. E., 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), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0054473.
- Maneewongvatana, S. and Mount, D. M. (1999) 'It's okay to be skinny, if your friends are fat', *Center for Geometric Computing 4th Annual Workshop on Computational Geometry*, (October), pp. 1–8. Available at: <https://www.cs.umd.edu/~mount/Papers/cgc99-smpack.pdf>.
- Matsui, H., Randell, S. H., Peretti, S. W., Davis, C. W. and Boucher, R. C. (1998) 'Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces', *Journal of Clinical Investigation*, 102(6), pp. 1125–1131. doi: 10.1172/JCI2687.
- Mitran, S. M. (2007) 'Metachronal wave formation in a model of pulmonary cilia', *Computers and Structures*, 85(11–14), pp. 763–774. doi: 10.1016/j.compstruc.2007.01.015.
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M. and Duchesnay, E. (2011) 'Machine Learning in Python', *Journal of Machine Learning Research*, 12, pp. 2825–2830.
- Puchelle, E. and Zahm, J. M. (1984) 'Influence of rheological properties of human bronchial secretions on the ciliary beat frequency', *Biorheology*, 21(1–2), pp. 265–272. doi: 10.3233/BIR-1984-211-228.
- Puchelle, E., Zahm, J. M. and Quemada, D. (1987) 'Rheological properties controlling mucociliary frequency and respiratory mucus transport', *Biorheology*, 24, pp. 557–563.
- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-perez, O., Cholfin, J. A., Marin, O., Rubenstein, J. L. R., Tessier-lavigne, M. and Okano, H. (2006) 'New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain', *Science*, 311(February), pp. 630–632. doi: 10.1126/science.1119133.

Siddiqui, A. M., Farooq, A. A. and Rana, M. A. (2015) ‘A mathematical model for the flow of a casson fluid due to metachronal beating of cilia in a tube’, *Scientific World Journal*, 2015, pp. 1–12. doi: 10.1155/2015/487819.

Wan, K. Y. and Goldstein, R. E. (2016) ‘Coordinated beating of algal flagella is mediated by basal coupling’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(20), pp. E2784–E2793. doi: 10.1073/pnas.1518527113.

Figures

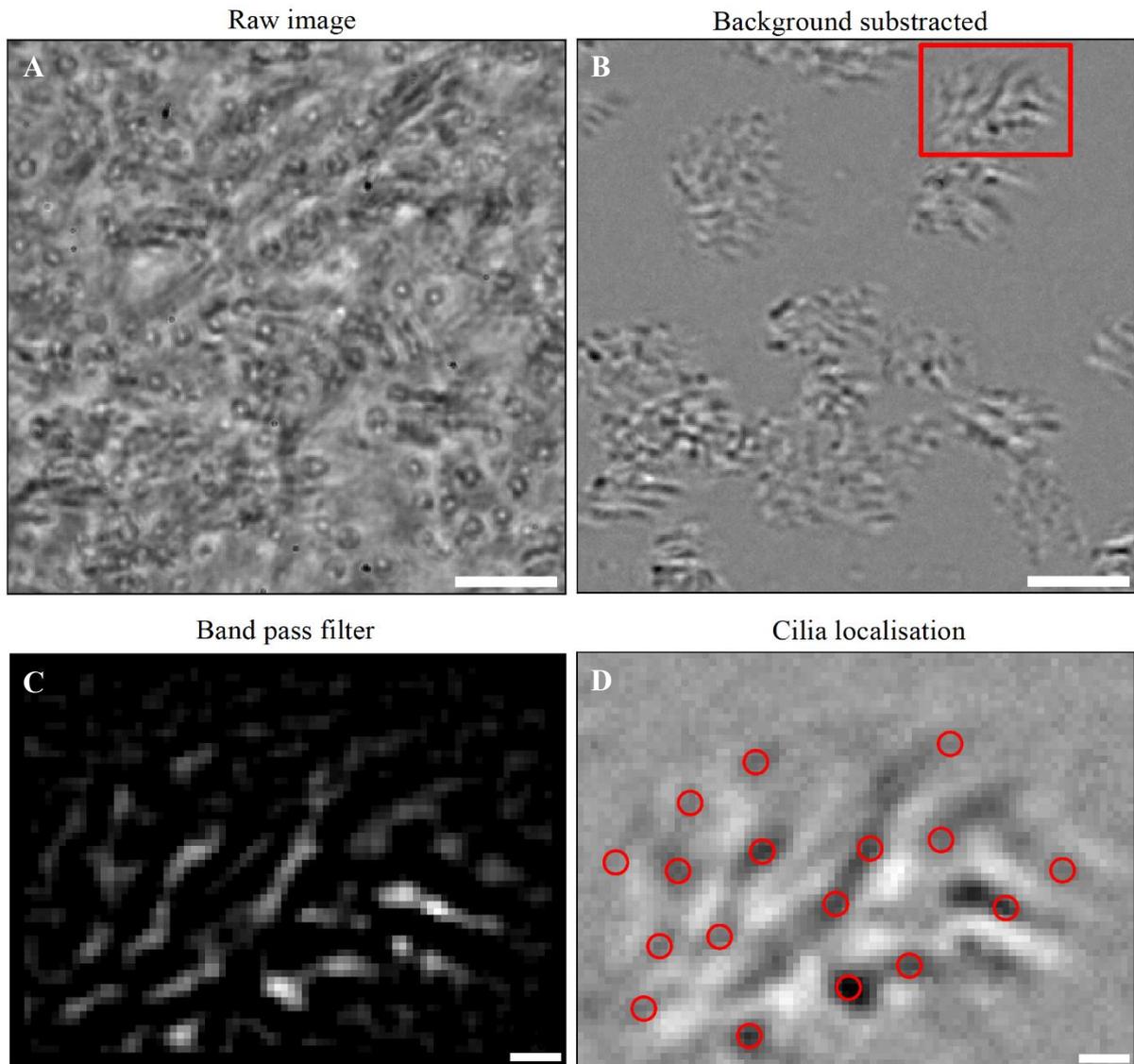


Figure 1: Steps of the image processing for the cilia tracking. A) Region of $300 \times 300 \text{ px}^2$ of a raw initial image obtained using optical microscopy. Scale bar: $15 \mu\text{m}$. B) Image with the background subtracted. Scale bar: $15 \mu\text{m}$. C) Zoom of $80 \times 60 \text{ px}^2$ (corresponding to the red box of panel B) of the filtered image with a band pass. Scale bar: $2 \mu\text{m}$. D) Localisation of the objects of interest (red circles) on the image with the background subtracted. Scale bar: $2 \mu\text{m}$.

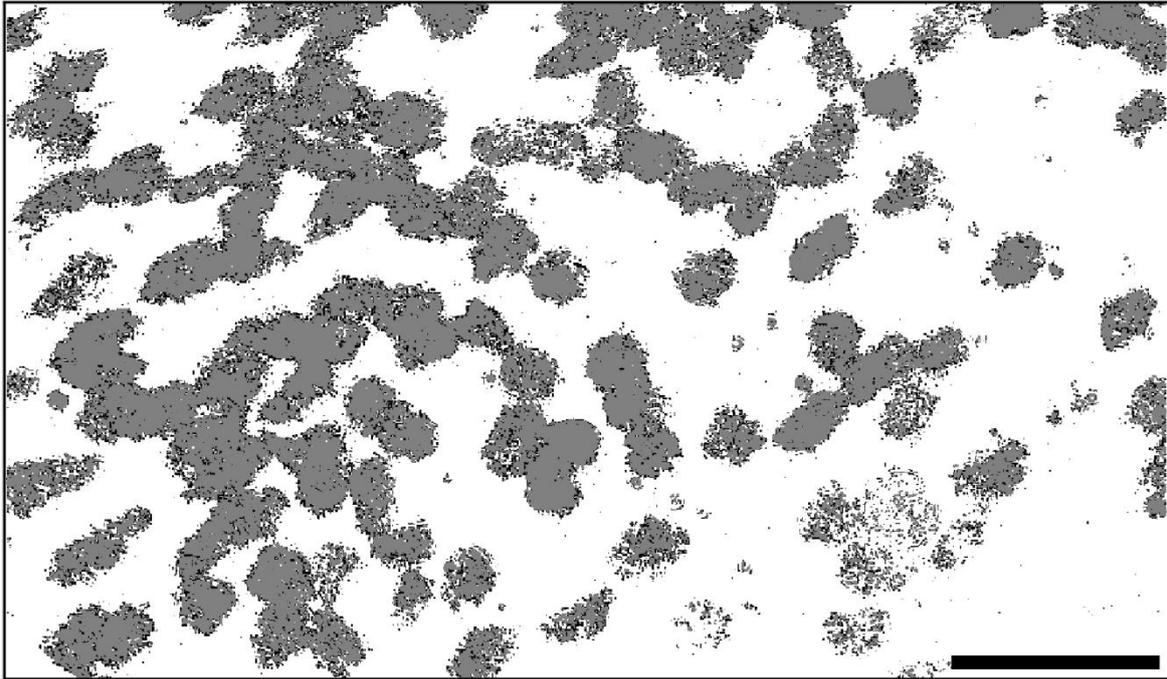
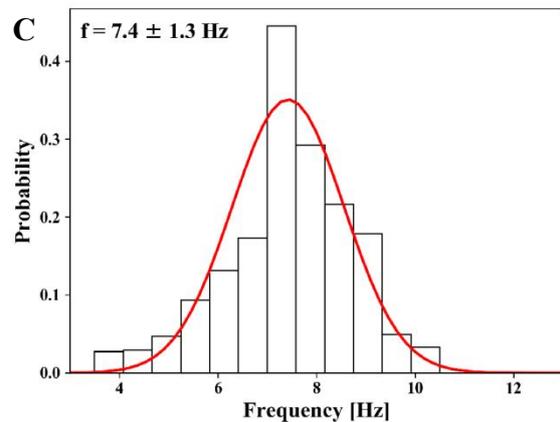
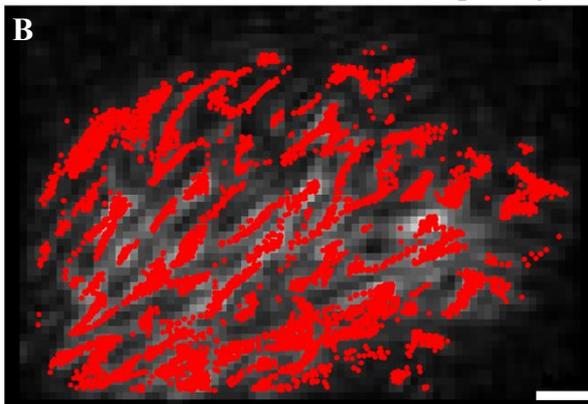
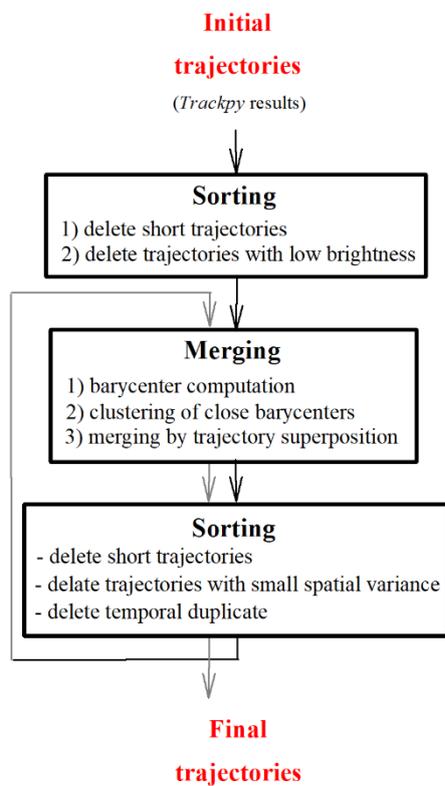
A**Density determination****Frequency determination**

Figure 2: Determination of the ciliated cell density that beating and their frequency. A) Estimation of the density and mapping of the two thresholds (in grey the lowest and in black the highest). The density value is $29 \pm 4\%$. Scale bar: $50\mu\text{m}$. B) Localisation of the pixels of interest (red dots) for all the images within a sequence corresponding to a zone of $80 \times 60 \text{ px}^2$. The image is the result of the summation of all the images filtered of the sequence. Scale bar: $2\mu\text{m}$. C) Histogram of the dominating frequency of each analysed pixel. A Gaussian fit (red curve) is applied to the distribution to determine the dominant frequency and its standard deviation: $8.0 \pm 1.2 \text{ Hz}$.

A Sorting and merging steps



B Merging by superposition of trajectory images

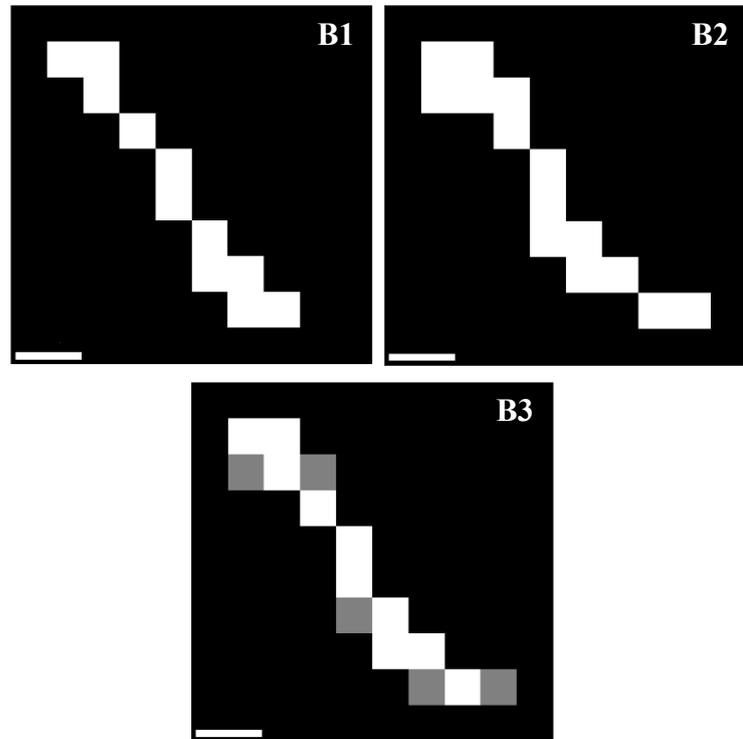


Figure 3: Procedure applied for the trajectory sorting and merging. A) Diagram of the sorting and merging steps. B) Illustration of the image of two trajectories, B1) (11 pixels) and B2) (14 pixels), and the superimposition of two images to the merging process B3). On B3) white pixels refer to areas with a superimposition (10 pixels) and grey pixels refer to areas of one of the two trajectories without overlap. In this case there is trajectory merging from the first step of merging ($10 > 11 \cdot 3/5$). Scale bar: 0.5 μm .

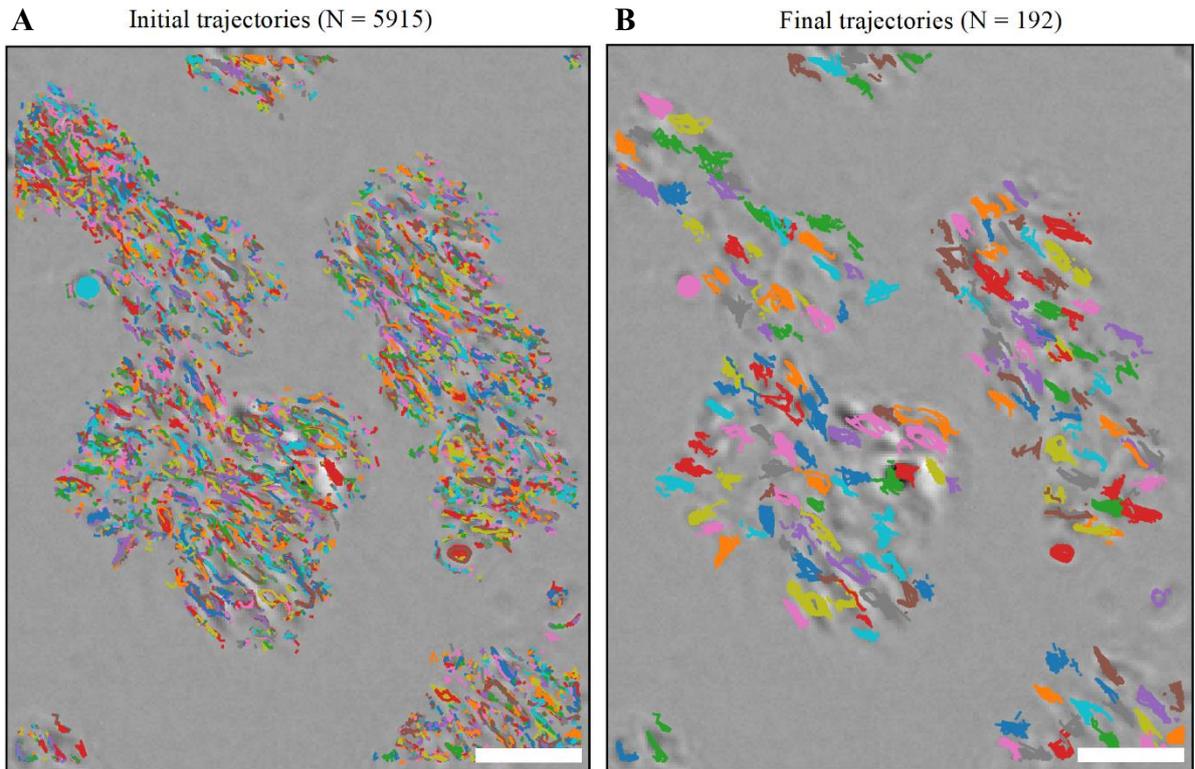


Figure 4: Result obtained after fusing and sorting trajectories on a region of 200×250 pixels². A) Results of the tracking with *trackpy* after a first step of sorting by temporal sampling and mean mass of trajectories. Total number of trajectories, N, found before the first sorting is 5915. B) Final trajectories remaining after all the fusing and sorting steps, N=192. Scale bar: 10 μ m.

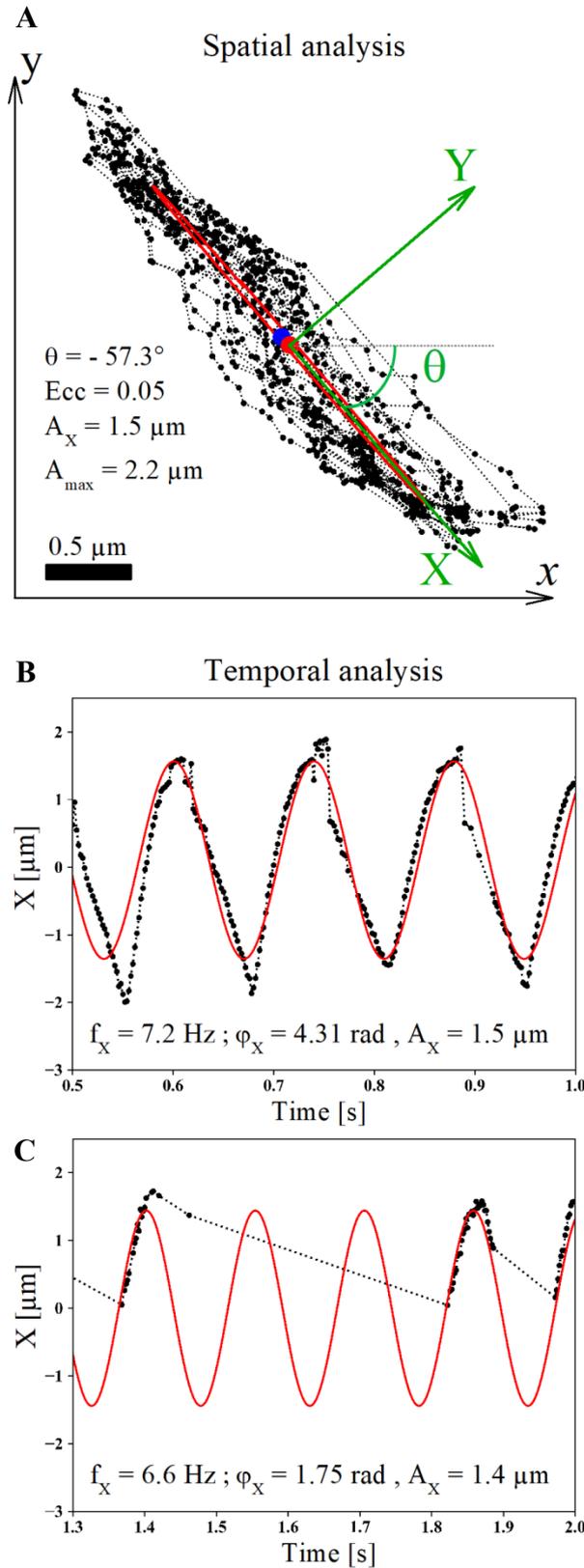


Figure 5: Spatiotemporal analysis of the trajectories. Example on one straight trajectory. A) Spatial analysis and axis reorientation on its beating axis, X , centred on its barycenter. The spatial cilium trajectory (over 2s) is displayed in black (being each dot the position of the cilium in each frame). The barycenter is the large blue dot. In green we show the results obtained for the inertia matrix analysis with the major axis X that correspond to the cilium beating axis, the minor Y and the orientation angle θ of the major axis X . In red are displayed the ellipse and its center (large red dot) which have been obtained using the temporal sinusoidal fit parameters (see Fig2B) on the reoriented axis X and Y . The fit amplitude A in both axis give the length of the major and minor axis of the ellipse. Their ratio, $\frac{A_Y}{A_X}$, gives the eccentricity, Ecc , of the trajectory. On this example we obtain a beating orientation θ of -40.2° , an eccentricity of 0.07, an amplitude A_X of $1.9 \mu\text{m}$ and a maximal amplitude of $2.6 \mu\text{m}$. Scale bar: $1 \mu\text{m}$. B) and C) Temporal analysis with the sinusoidal fit of the temporal trajectory on the reoriented X axis. The dashed line with the small dots are the raw trajectory with the position on each frame. The red solid line is the fit. The values of the frequency f , the phase φ and the amplitude A , obtained by the fit of $X(t)$, are also displayed. B) Examples of a trajectory with a good spatial sampling (that correspond to the trajectory in A) and C) one with a bad spatial repartition and a loss of the trajectory on some periods.

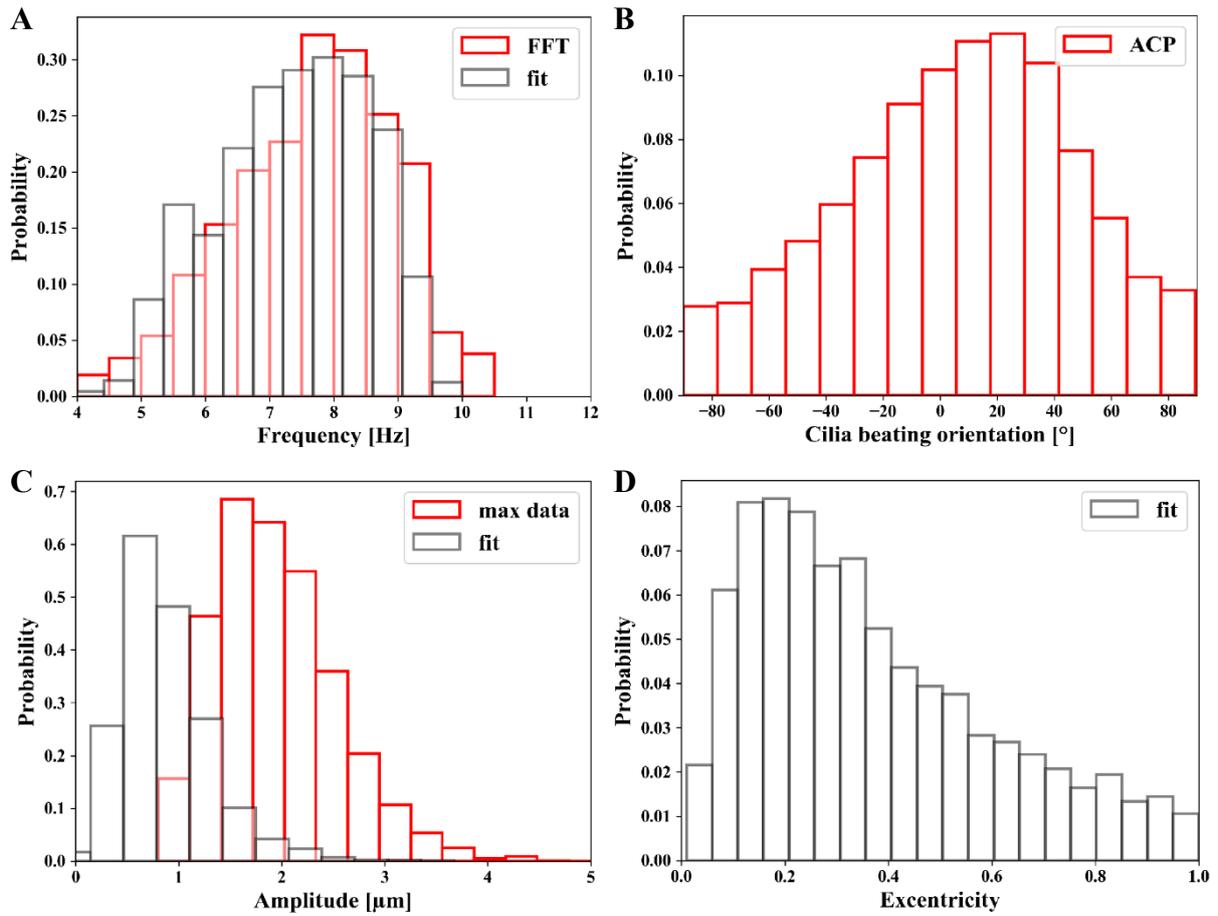


Figure 6: Distribution of spatiotemporal parameters obtained for all trajectories within the tissue area ($\sim 80\,000\ \mu\text{m}^2$). A) Beating frequency determined by the FFT of the light variation (red) and the sinusoidal fit (black). B) Beating orientation θ determined by the inertial matrix analysis of the trajectory. C) Beating amplitude determined by the maximum extension of the trajectory (red) and the sinusoidal fit (black). D) The eccentricity of the trajectory, determined using the sinusoidal fit.

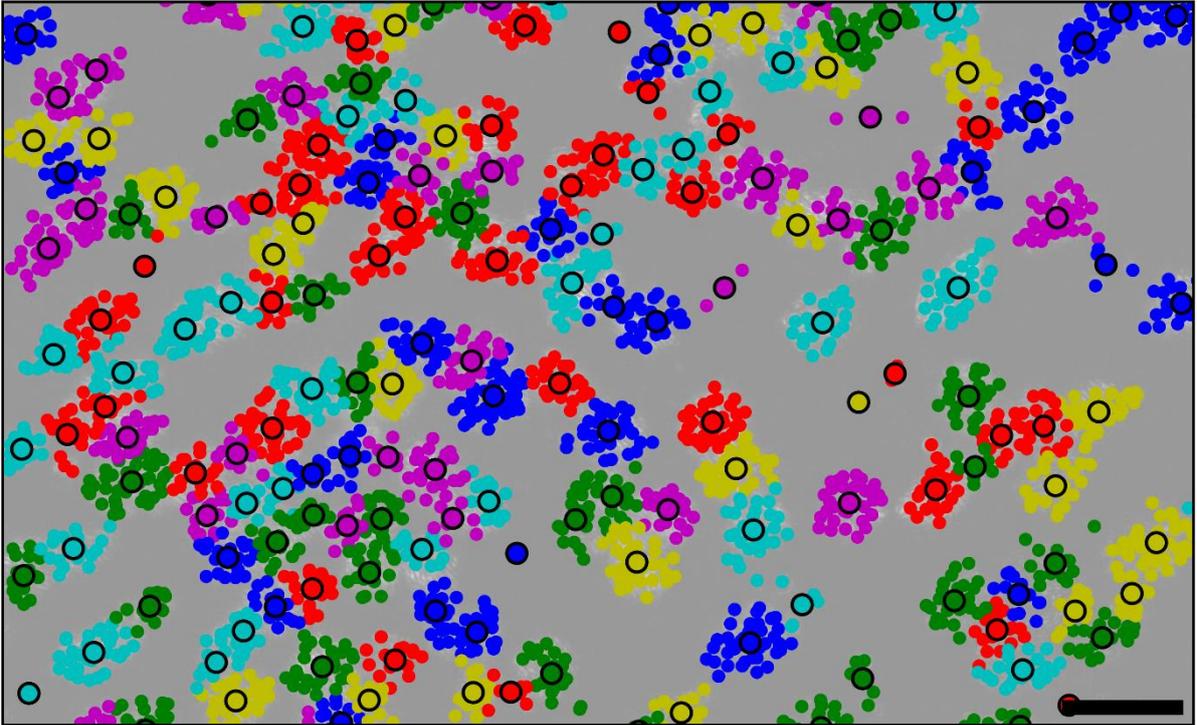


Figure 7: Clustering by ciliated cells using the Mean Shift algorithm. Black bar = 25 μm .

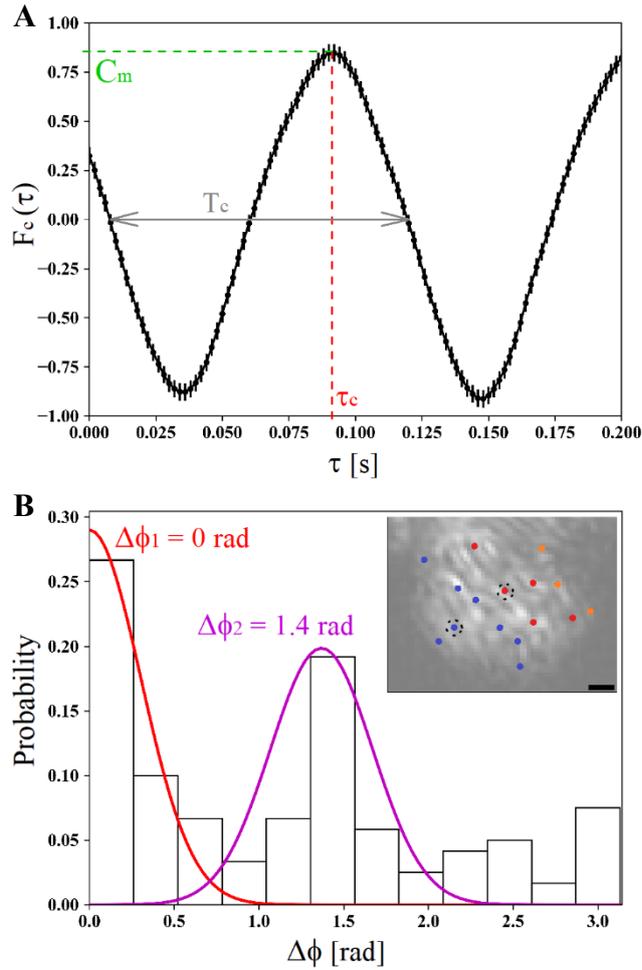


Figure 8: Temporal correlation inside a ciliated cell. A) The correlation function as a function of the time delay chosen for a cilia pair inside a same ciliated cell (cluster). The error bars are the inverse of the root square of the number of data for each time delay. B) Distribution of the phase shift $\Delta\phi = 2\pi \tau_c / T_c$, obtained for each cilia pair inside a cluster. Two Gaussian fits (red and magenta) are applied to the two main probability distributions of the phase shift. In the inset, the position of cilia inside the cluster with different phase beating groups is displayed. Here 2 main groups, in blue and red-orange, with phase shifts around $\Delta\phi_2$. The orange group is almost in phase with the red group. The two points surrounded by black dashed circles correspond to the cilia pair shown in panel A). Scale bar = 2 μm .

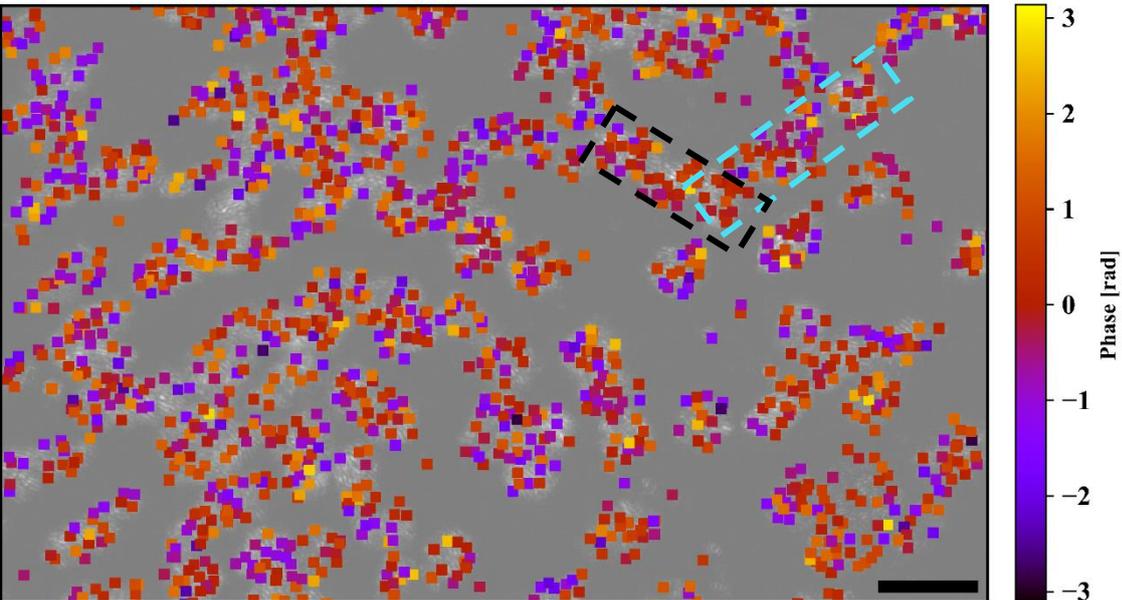
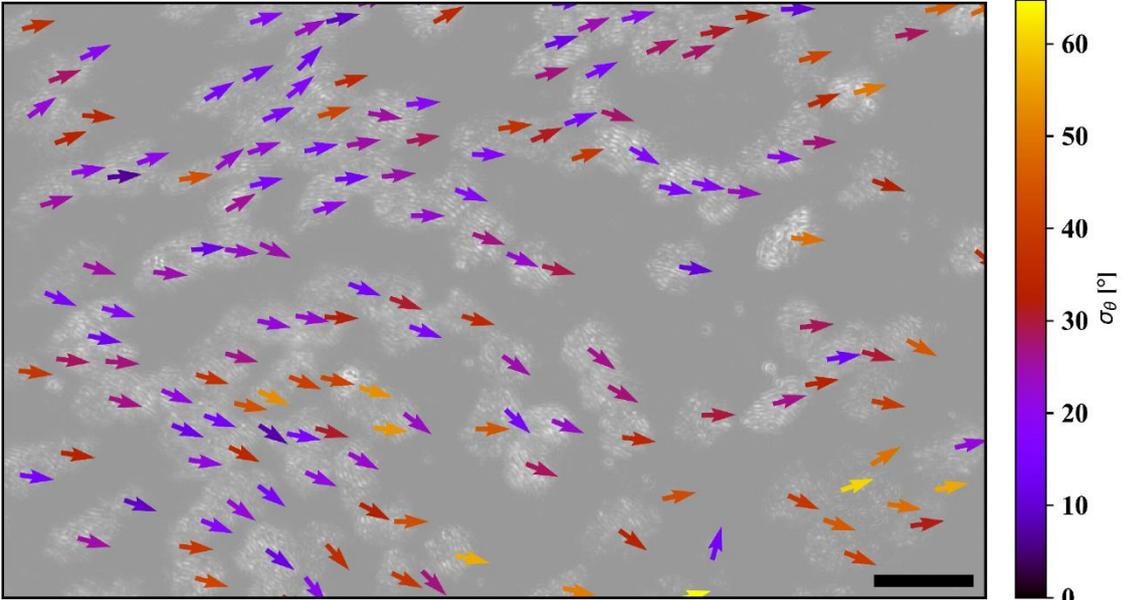
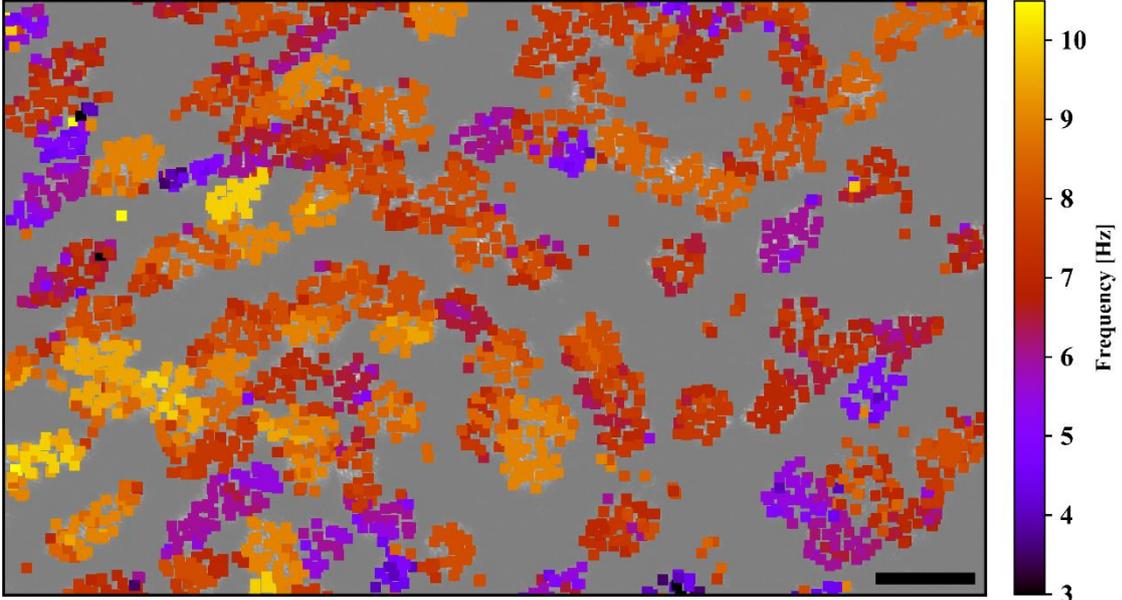


Figure 9: Mapping of the cilia activity. A) Spatial repartition of the beating frequency of each cilium. B) Average beating orientation of each cilia cell (arrows) with its standard deviation σ_θ (color bar). C) Mapping of the phase of each trajectory determined by the sliding fit on the first 3 beating cycles of the video. Rectangles show two different areas with a well-defined metachronal wave or in phase cilia on 2 or 3 adjacent cells. In blue a metachronal wave with an alignment perpendicular ($\lambda=23.4 \pm 1.0 \mu\text{m}$) and in black an in phase area. Scale bar = 25 μm .

II.2.3. Calcul du champ de vitesse de transport

Le champ de vitesse de transport du mucus ou du fluide sur l'épithélium est obtenu grâce au suivi de billes dispersées dans le mucus ou d'impuretés déjà présentes. Le traitement des vidéos se fait sous Python, comme pour l'analyse du battement ciliaire (voir article 3), avec le module *Trackpy* pour la localisation et le suivi des particules. Les étapes sont les mêmes que décrit précédemment mais les paramètres du filtre passe-bande et des fonctions de localisation 'locate' et de suivi 'link_df' sont adaptés aux objets choisis comme traceurs : les microbilles ou les débris et impuretés. Une fois les trajectoires obtenues, une sélection selon la durée et la longueur des trajectoires permet d'éliminer les groupes de cils très contrastés qui ont pu être détectés ainsi que d'autres objets source d'artefact (poussières, aspérités du tissu non entièrement éliminées par le traitement des images, ...). Nous avons choisi une valeur minimale de 10 images pour la durée, qui doit être adaptée en fonction de la distance de déplacement des objets entre deux images successives et de la qualité optique des objets détectés. La valeur minimale retenue pour le déplacement carré moyen de la particule est $1,5 \mu\text{m}^2$, soit une valeur supérieure de 50% à la plus grande valeur obtenue pour les trajectoires des cils comprise majoritairement entre $0,5$ et $1 \mu\text{m}^2$.

L'intervalle de temps sur lequel la vitesse est calculée doit être choisi avec soin en tenant compte des effets du bruit thermiques présents sur nos trajectoires (Figure 62A-B) et en conservant les variations spatiotemporelles du champ de vitesse. La Figure 62C compare les vitesses obtenues en les calculant sur différentes durées, de 2, 10 et 50 images successives. Nous avons choisi une valeur de 10 images qui nous semble être le meilleur compromis. Pour chaque trajectoire, la vitesse (module et orientation) est déterminée en fonction du temps avec un pas de temps d'une image. A partir de ces valeurs, nous déduisons la valeur de la vitesse V_m correspondant au maximum de la distribution statistique sur la durée du film (Figure 62D). La distribution statistique de V_m , sur l'ensemble des trajectoires présentes sur la zone d'analyse, est gaussienne. Dans le chapitre qui suit et qui décrit nos résultats, nous reporterons pour chaque zone analysée la moyenne de cette distribution.

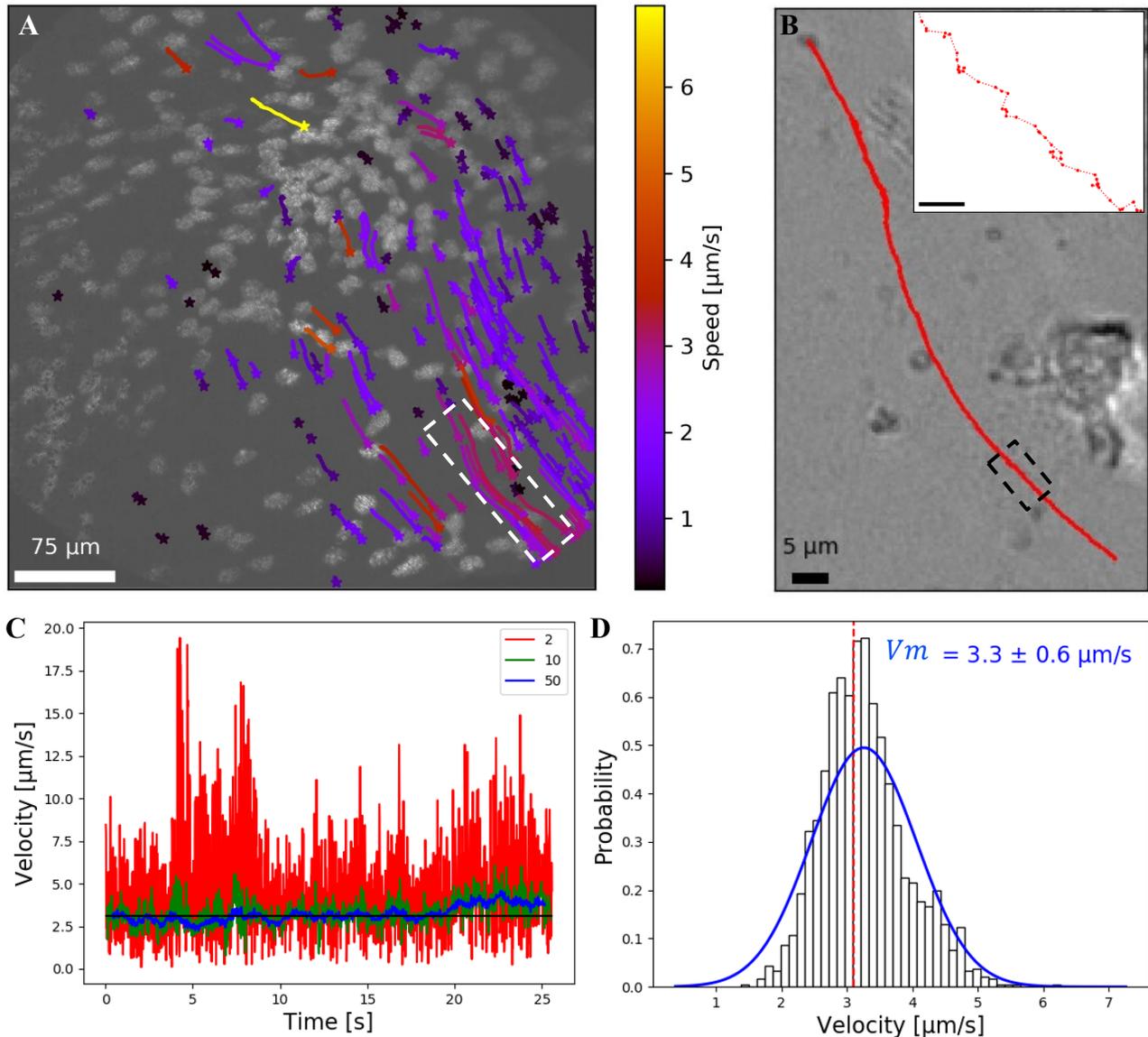


Figure 62 : Trajectoires des objets transportés sur l'épithélium et méthode de calcul de la vitesse de transport. A) Trajectoires des objets transportés sur l'épithélium. Les traits représentent les trajectoires des billes, l'étoile au bout indique le sens de déplacement et la couleur représente la vitesse de transport moyenne sur l'ensemble de la trajectoire. L'image de fond est la somme des images différentielles avec un pas temporel de 16,7 ms (1 image) filtrées avec un passe bande afin de faire ressortir les cellules ciliées qui battent (zones blanche). Le rectangle marque la zone d'où est issue la trajectoire illustrée en B). Barre d'échelle : 75 μm . B) Exemple d'une longue trajectoire courbe. L'image est la première de la vidéo avec le fond soustrait. Barre d'échelle : 5 μm . Le rectangle correspond à la zone agrandie représentée en insertion qui montre le déplacement par à-coup de la bille. Barre d'échelle de l'insertion : 500 nm. C) Détermination de la vitesse au cours du temps de la trajectoire illustrée en A) sur des intervalles de temps glissants de 2 (rouge), 10 (vert) et 50 (bleu) images successives. Le trait noir représente la vitesse déterminée en prenant l'ensemble de la trajectoire (du point initial au point final). D) Distribution de la vitesse sur les différents intervalles de 10 images successives de la trajectoire. La ligne rouge en pointillés représente la vitesse déterminée sur l'ensemble de la trajectoire et la ligne bleu l'ajustement gaussien de la distribution appliqué pour définir la vitesse dominante de la trajectoire retenue par la suite.

II.3. Caractérisation de l'activité ciliaire et du transport du mucus

Dans cette première partie, nous avons choisi de caractériser l'activité ciliaire et le transport du mucus selon quelques variables simples à obtenir : la densité surfacique de cellules ciliées actives (qui battent) à la surface de l'épithélium, la fréquence de battement des cils, et la vitesse de la couche de mucus mise en mouvement sur le tissu grâce à cette activité. La comparaison de ces paramètres est effectuée entre les différentes cultures (milieu BEGM ou PneumaCult, type de patients, variabilité intra et inter puits), mais également en fonction de différents stimuli extérieurs (tabac, réduction du calcium Ca^{2+} , modification de la viscoélasticité et de l'épaisseur de la couche de mucus). L'évolution de l'activité ciliaire et de l'organisation du transport face à ces stimuli est discutée ainsi qu'en fonction du développement de la culture.

II.3.1. Comparaison entre les cultures BEGM et PneumaCult et entre les trois groupes de patients

L'activité ciliaire (densité surfacique de cellules ciliées actives et fréquence de battement des cils) et la vitesse de transport du mucus sont caractérisées pour trois différents groupes de patients (témoins, fumeurs et BPCO). Un marqueur de la pathologie BPCO sur l'activité ciliaire et l'efficacité du transport est particulièrement recherché. L'analyse est effectuée pour les deux méthodes de cultures réalisées avec les milieux BEGM ou Pneumacult. Les résultats obtenus sont résumés sur la Figure 63. Comme discuté dans la présentation des modèles d'épithélia que nous avons utilisé (premier chapitre sur l'épithélium, partie 3.2), les deux méthodes de culture ALI, utilisant respectivement les milieux BEGM et PneumaCult, ont donné des épithélia significativement différents en termes de vitesse de développement, taille et cohésion des cellules, et proportion de chaque type cellulaire présent (basal, cilié, caliciforme, ...). Pour cette raison, la comparaison entre groupes de patients (témoins, fumeurs et BPCO) est effectuée séparément sur les cultures BEGM et PneumaCult. La comparaison entre cultures se fait pour une maturité de la culture de respectivement 28 jours (J28) avec le milieu BEGM et 21 jours (J21) pour le milieu PneumaCult. Pour quelques cultures pour lesquelles cela n'a pas été possible à J28/J21, l'analyse a été réalisée à plus ou moins 2 jours près. Pour chaque culture, les valeurs des trois paramètres densité, fréquence et vitesse, reportées sur les graphes de la Figure 63 correspondent aux valeurs moyennées sur l'ensemble des acquisitions effectuées sur les différents puits (2 à 3) et les différentes localisations sur le puits (3 à 5).

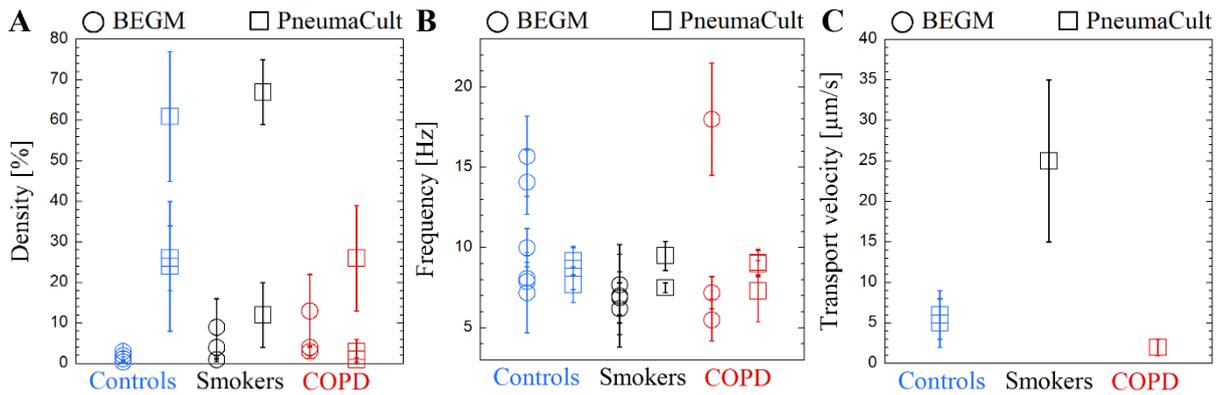


Figure 63 : Comparaison de l'activité ciliaire et de la vitesse de transport entre les deux protocoles de cultures (milieu BEGM (cercles) et milieu PneumaCult (carrés)) et les 3 groupes de patients : témoins (bleu), fumeurs (noir) et BPCO (rouge). A) Densité surfacique de cellules ciliées actives, B) Fréquence de battement des cils, et C) Vitesse du transport du mucus. Pour chaque paramètre, les symboles correspondent à la valeur moyenne d'un patient à 28 et 21 jours depuis le début de la différenciation pour respectivement les cultures avec le milieu BEGM et le milieu PneumaCult. Les barres d'erreurs représentent la dispersion des valeurs par patient, pour le jour considéré, sur les différents puits et zones du tissu imaged.

La différence en densité surfacique de cellules ciliées actives, entre les cultures utilisant le milieu BEGM et celles utilisant le milieu PneumaCult, est nettement significative, avec une p-value de 0,03 (Figure 63A), comme l'a également montré l'étude de Hou *et al.* (Hou et al. 2017b). Cette valeur a été déterminée avec un test de t-student sur l'ensemble des cultures disponibles, indépendamment de leur groupe (témoin, fumeur, BPCO), soit 13 cultures pour le milieu BEGM et 8 cultures pour le milieu PneumaCult. La différence entre les deux groupes est considérée comme significative pour une p-value inférieure à 0.05. La très faible densité surfacique de cellules ciliées actives à J28 avec le milieu BEGM, de 5% en moyenne, ne nous a pas permis de détecter un transport dans la couche de mucus, d'où l'absence de résultats pour ces cultures sur la Figure 63C. La même raison explique le faible nombre de mesures avec le milieu BEGM à J21. Le lien entre la densité de cellules ciliées et le transport est discuté plus loin (partie II.3.4.2.). En revanche, les fréquences de battement des cils obtenues pour les deux modes de culture sont proches avec une moyenne autour de 8 Hz, bien que les valeurs mesurées s'étalent de 4 à 21 Hz (Figure 63B), et ne sont pas significativement différentes selon un test t-student.

Pour répondre à la question de l'utilisation de l'activité ciliaire et de la vitesse de transport du mucus comme marqueur de la BPCO, la grande hétérogénéité des mesures pour un même patient (cf Figure 70) et entre patients, et le peu d'échantillons analysés, ne permettent pas d'obtenir une différence significative (p-value < 0,05) entre les trois groupes étudiés (témoin, fumeur, BPCO). Ce constat est partagé sur les trois paramètres mesurés et sur les deux protocoles de cultures.

II.3.2. Quelques exemples sur l'effet de drogues spécifiques

II.3.2.1. Effet d'une inhibition de la régulation du calcium intra-cellulaire

La régulation de l'activité ciliaire est l'un des mécanismes fondamentaux permettant aux cils d'adapter leur battement aux modifications de son environnement (cf partie II.1.1.2). L'un des principaux éléments mis au jour ces dernières années intervenant dans cette régulation intracellulaire et intraciliaire est la concentration en calcium Ca^{2+} intracellulaire (L. Liu et al. 2014; Salathe 2007). Afin de quantifier l'effet de la concentration en calcium sur différentes activités de l'épithélium (production du mucus, activité ciliaire, activité immunitaire inflammatoire, réparation cellulaire, expression génétique) et de mettre en évidence le rôle du canal ORAI3 dans la régulation du Ca^{2+} , une étude a été menée au sein de notre équipe, à l'hôpital universitaire de Montpellier Arnaud de Villeneuve, par Aurélie Petit (Petit et al. 2019). L'un des résultats concernant l'activité ciliaire (densité et fréquence du battement ciliaire), et pour lequel j'ai participé à l'acquisition de vidéo et au traitement des données, est présenté sur la Figure 64. Les cultures ALI ont été exposées aux drogues EGTA (2mM) visant à diminuer la concentration en Ca^{2+} , et GSK (10 μM) destinée à bloquer le canal ORAI3 participant à la régulation du Ca^{2+} intraciliaire, pendant 30 minutes (cf protocole au chapitre II.2.1.4.). L'effet sur la densité de cellules ciliées qui battent et la fréquence de battement a été mesuré pour les trois groupes de patients (témoins, fumeurs, BPCO). Bien que la densité de battement semble diminuer en présence d'EGTA pour les 3 groupes, la p-value n'est pas significative (Figure 64A). Sur la fréquence de battement, il n'y a pas de tendance nette observée et le groupe témoin semble réagir différemment du groupe BPCO avec dans un cas une diminution de la fréquence et dans l'autre une augmentation (Figure 64B). Pour le GSK, on observe une diminution significative de la densité et de la fréquence de battement pour le groupe témoin, avec une p-value de respectivement 0,0234 et 0,0078 (Figure 64C et D). Le blocage du canal ORAI3 a donc bien un effet sur la régulation du calcium et donc l'activité ciliaire. En revanche, cet effet n'est pas observé significativement sur les groupes fumeurs et BPCO et semble même inexistant sur la densité surfacique de cellules ciliées actives. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le canal ORAI3 est déjà déficient pour ces groupes de patients (Petit et al. 2019; Lin et al. 2016).

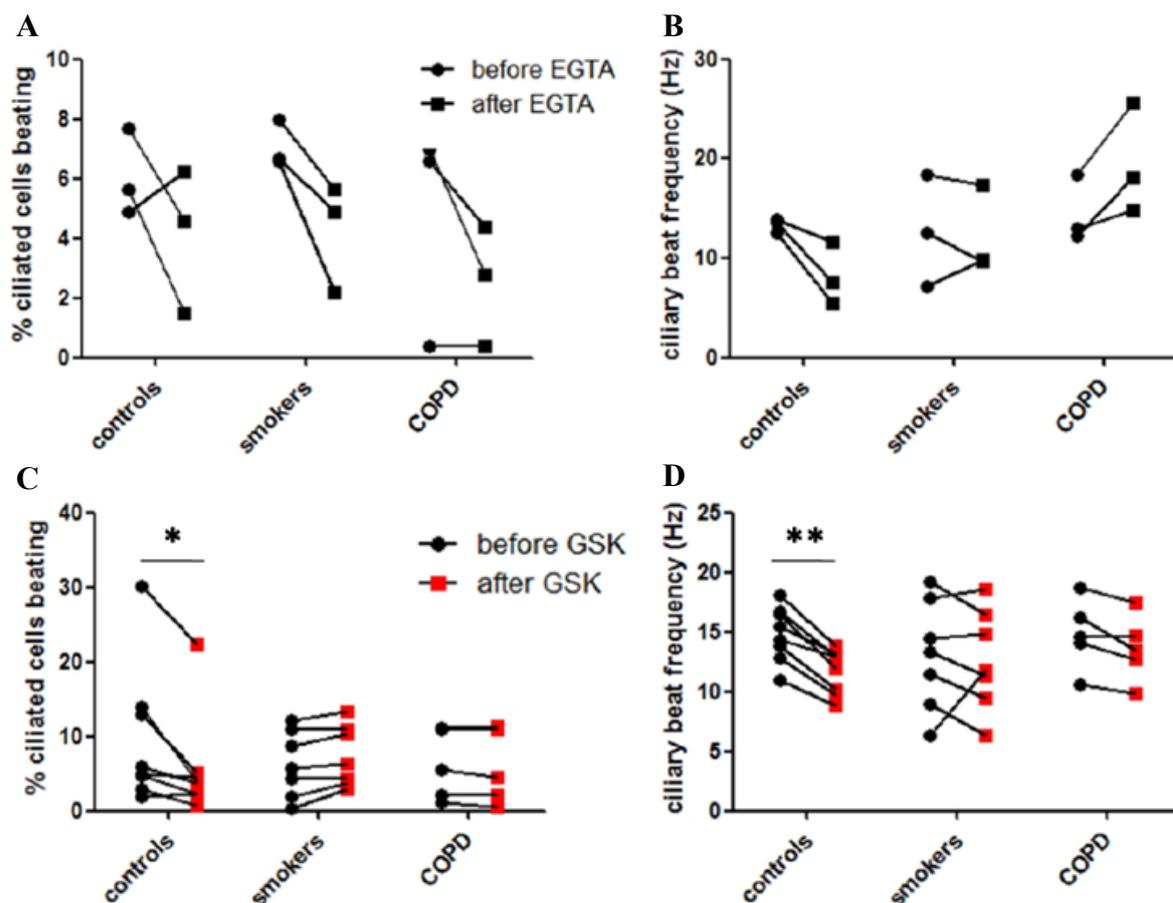


Figure 64 : Impact d'une diminution de la concentration en calcium Ca^{2+} (EGTA) A) et B) ou d'une diminution de sa régulation intracellulaire (GSK) C) et D) en fonction du type de patient (témoin, fumeur ou BPCO). Les panneaux A) et C) représentent la densité à la surface du tissu de cellules ciliées qui battent et les panneaux B) et D) représentent la fréquence de battement des cils. Chaque point représente la moyenne des mesures sur un puits. Les astérisques indiquent une p -value significative ($<0,05$) entre 2 groupes, déterminée grâce à un test de t -student.

La Figure 65 montre un exemple, sur une culture issue d'un patient fumeur, de la variation de la densité de cellules ciliées qui battent et de la fréquence de battement, sur l'ensemble des conditions testées sur cette expérience. Ces conditions sont : le puits normal sans incubation, l'incubation contrôle au PBS, celles à l'EGTA et au GSK avec trois concentrations différentes (celle de $10 \mu\text{M}$ (GSK2) qui correspond à celle illustrée sur la Figure 64, la concentration de $1 \mu\text{M}$ (GSK1) et celle à $100 \mu\text{M}$ (GSK3)). Pour l'étude comparative entre patients, la concentration de GSK de $1 \mu\text{M}$ a été abandonnée car les effets détectés étaient en moyenne trop faibles, tandis que celle à $100 \mu\text{M}$ étant trop élevée, cela provoquait, pour la majorité des cultures, la mort totale ou partielle du tissu avec un éclatement (turgescence) et un décrochement des cellules dus à un déséquilibre osmotique trop important.

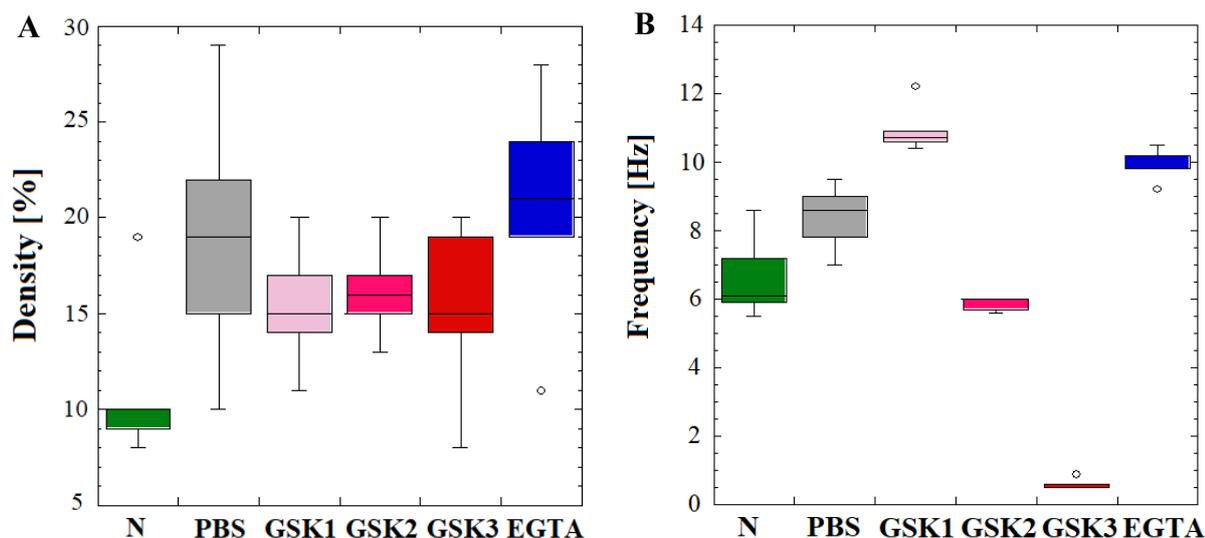


Figure 65 : Evolution A) de la densité surfacique de cellules ciliées actives et B) de la fréquence de battement des cils, en fonction de la drogue et/ou de la concentration à laquelle la culture a été exposée, dans le cas d'un patient fumeur. Les abréviations se réfèrent respectivement de gauche à droite à la condition normale 'N'(vert), puis l'incubation pendant 30 min de 500 μ L : de solution tampon 'PBS' (gris) ; de solution avec une concentration en GSK de 1 μ M 'GSK1' (rose clair), 10 μ M 'GSK2' (rose foncé) et 100 μ M 'GSK3' (rouge) ; et de solution avec 2mM d'EGTA (bleu). Les boîtes représentent la dispersion des mesures sur 5 localisations du puits, elles sont centrées sur la moyenne et leur hauteur est égale à deux fois l'écart type de la distribution. La ligne noire pleine représente la médiane et les barres s'étendent du premier au neuvième décile de la distribution. Les ronds sont des points extrêmes qui sortent de la distribution gaussienne des mesures.

Effet de l'augmentation de la charge. L'un des points importants à souligner dans cette expérience est l'impact significatif d'un ajout de 500 μ L de PBS sur le tissu que ce soit sur la densité de cellules ciliées qui battent ou leur fréquence de battement (p-value de respectivement 0,012 et 0,035 sur cette culture). Cette augmentation significative de la densité et de la fréquence de battement a été observée systématiquement sur toutes les cultures 30 minutes après l'ajout de 500 μ L de PBS. Nous avons fait la même observation avec seulement 50 μ L de PBS ou de milieu nutritif et après seulement 5 minutes d'attente, pour d'autres expériences destinées à suivre le transport du mucus et de disperser des microbilles billes. L'augmentation de la fréquence de battement, ainsi que l'augmentation du nombre de cellules actives pourrait s'expliquer par une dilution du mucus, entraînant une diminution de sa viscoélasticité et donc des contraintes mécaniques s'opposant au mouvement des cils. Le même phénomène de dilution pourrait également être responsable d'une diminution de la pression osmotique et/ou des propriétés d'adhésion, qui pourraient également jouer un rôle sur l'activation et l'activité du battement ciliaire. On ne peut pas écarter par ailleurs, une stimulation du tissu due à l'augmentation brutale de l'épaisseur de la couche et donc de son poids sur l'épithélium. Cela pourrait entraîner une réduction brusque de l'épaisseur de la couche péri-ciliaire (PCL) et l'activation du tissu pour retourner à un état d'équilibre, comme l'a montré l'étude de Liu et al. (L. Liu et al. 2014). Cette

dernière hypothèse nous semble la plus probable aux vues des études présentes dans la littérature sur ce sujet (L. Liu et al. 2014; Klindt et al. 2016), et de nos observations de l'augmentation de l'activité ciliaire même avec l'ajout d'un fluide plus viscoélastique que le mucus (cf partie II.3.3.).

II.3.2.2. Impact du tabac

Le tabac est cité depuis de nombreuses années comme l'une des causes de dysfonctionnement de l'épithélium des voies aériennes, notamment dans la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Le tabagisme est également incriminé dans les risques de malformations du fœtus et de capacité respiratoire diminuée dès la naissance (Bosdure and Dubus 2006). Nous avons cherché à observer et quantifier les effets des composés du tabac, sans fumée (application en solution), sur la densité de cellules ciliées qui battent, la fréquence de battement et la vitesse de transport (Figure 66). Pour cela, un extrait de tabac, le CSE (Cigarette Smoke Extract) est mis en solution dans un liquide tampon (PBS), avec une concentration de 5%, et incubé à la culture de l'épithélium de façon périodique au cours de la phase de différenciation de la culture (cf partie méthodes II.2.1). L'effet conjugué du tabac et d'une agression bactérienne a également été observé en ajoutant de l'extrait des membranes de bactéries, le lipopolysaccharide (LPS), à la solution de tabac (1µg/mL). Les récepteurs spécifiques du LPS doivent déclencher une réaction immunitaire du tissu, préférentiellement inflammatoire.

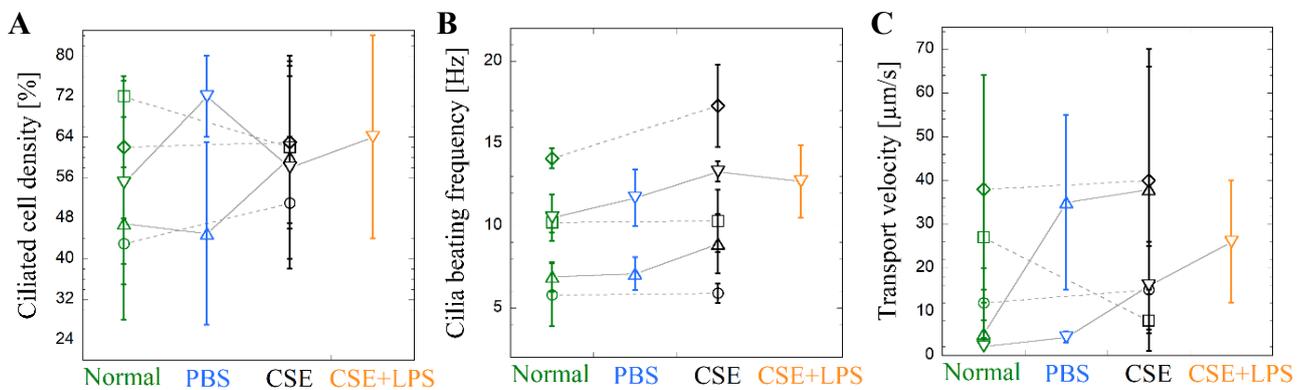


Figure 66 : Impact du tabac sur la densité de cellules ciliées qui battent à la surface de l'épithélium A), sur la fréquence de battement B), et sur la vitesse du transport mucociliaire C). 4 conditions sont testées : le puits sans incubation ('Normal', vert), le puits incubé avec la solution tampon pure ('PBS', bleu) qui constitue le contrôle pour les autres substances testées, le puits incubé avec de l'extrait de tabac en solution ('CSE', noir), et le puits incubé avec de l'extrait de tabac et des débris de bactéries ('CSE+LPS', orange). Chaque symbole représente un patient différent et les lignes grises sont un guide pour voir la variation en fonction des conditions pour chaque patient, avec en trait plein les patients où l'incubation contrôle au PBS a été réalisée (N=2) et en pointillés les patients où cela n'a pas été réalisée (N=3). La barre d'erreur représente la dispersion sur les 5 zones du puits analysées.

Comme le montre la Figure 66A, que ce soit l'incubation chronique (PBS pur), la présence d'extrait de tabac (CSE) ou l'agression du tissu pro-inflammatoire par le LPS, la densité de cellules ciliées qui battent sur l'épithélium n'est pas impactée en tenant compte de la variabilité sur la surface du tissu (barres d'erreurs). Sur la fréquence de battement et la vitesse de transport (Figure 66B et C), si l'on regarde les deux patients où l'incubation contrôle dans la solution tampon pure a été effectuée (symboles triangulaires vers le haut et vers le bas), il semble y avoir une augmentation due à l'incubation (N-PBS) mais également à la présence de tabac (PBS-CSE). Un effet de l'agression bactérienne semble également être visible dans le seul cas testé (symboles triangulaires vers le bas), avec une augmentation de la vitesse de transport. Mais les p-value calculées grâce à un test de student sur les valeurs des 5 zones par condition (puits) sont toutes supérieures à 0,05. L'absence de différences significatives entre les 4 conditions, que ce soit sur l'activité ciliaire ou la vitesse du transport, peut être due à la grande disparité des données sur le même tissu et le faible nombre de patients auxquels nous avons eu accès. En particulier, la condition de contrôle qui est l'incubation avec le PBS seul n'a été réalisée que pour 2 patients. Il faudrait effectuer plus de 5 zones d'acquisitions sur l'épithélium pour extraire une comparaison plus robuste et pouvoir trancher sur l'effet de l'incubation et du tabac.

En raison du battement ciliaire, le mucus vibre à une fréquence et avec une amplitude reliées à l'activité ciliaire. Sur la seule culture pour laquelle la condition 'CSE+LPS' a été testée, nous avons mesuré ces deux paramètres dans l'épaisseur du mucus en fonction de la distance à l'épithélium, ainsi que de la vitesse du transport associée (Figure 67). Ces mesures ont été effectuées avec le même dispositif mis au point pour mesurer la rhéologie du mucus en fonction de la distance au tissu, c'est à dire dans une chambre scellée avec la couche de mucus à l'interface entre le tissu et une lamelle de verre. Sur des microbilles de 3 μm de diamètre (résine de mélamine carboxylées), dont la trajectoire est obtenue par suivi de particule avec 'Trackpy' (cf article 3), la fréquence et l'amplitude de vibration sont obtenues par un ajustement sinusoïdal de la vibration de la bille après soustraction du déplacement dû au transport. Comme attendu, la fréquence de vibration est conservée dans l'épaisseur de la couche de mucus pour les 4 conditions, en tenant compte des incertitudes (Figure 67A). La fréquence mesurée est cependant près de 2 fois plus faible que lors de l'acquisition dans la boîte de cultures en interface air-liquide (Figure 66B). Cette baisse de la fréquence pourrait être due aux différences de conditions expérimentales, avec dans le cas de la chambre entre lame et lamelle scellées l'absence d'interface avec l'air et une température plus basse (autour de 25°C). En revanche, l'amplitude de vibration et la vitesse de transport du mucus diminuent avec l'éloignement au tissu pour les 4 conditions, bien que cela soit moins net pour le puits incubé au CSE+LPS (Figure 67B et C). La vitesse du transport semble également un peu plus importante pour les puits incubés au CSE et au CSE+LPS.

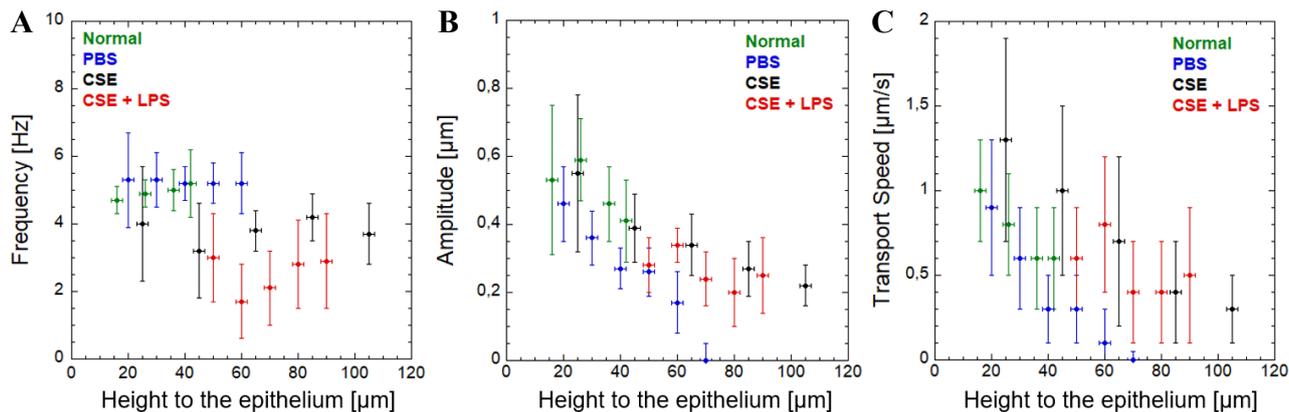


Figure 67 : Evolution de l'activité ciliaire et de la vitesse de transport en fonction de la distance au tissu. Pour 4 puits issus d'un même patient BPCO sévère, et dont chaque puits représente une condition expérimentale (Normal (vert), une incubation respectivement au PBS (bleu), au CSE (noir) et au CSE+LPS (rouge)), la fréquence A) et l'amplitude B) de vibration de microbilles piégées dans le mucus, ainsi que la vitesse de déplacement à longue distance des billes C) sont mesurées. Les barres d'erreur représentent la dispersion des mesures sur le déplacement des différentes billes analysées et le point se réfère à la moyenne.

Cette absence de résultats significatifs entre les 4 conditions, que ce soit sur l'activité ciliaire ou la vitesse du transport, peut être due, comme discuter précédemment, à la grande disparité des données sur le même tissu (cf Figure 70) et le peu de patients analysés, notamment avec la condition contrôle qu'est l'incubation au PBS pur (N=2).

Effet de l'incubation par un fluide newtonien à la viscosité proche de l'eau. L'autre observation effectuée lors de cette expérience et l'impact de l'incubation sur l'activité ciliaire et le transport de mucus. Une augmentation de la fréquence de battement et de la vitesse de transport due à l'incubation semble cohérente. En effet, l'ajout de PBS sur le tissu, pendant 6h tous les 2 jours, pourrait induire une dilution de la couche de mucus et donc une diminution de sa viscoélasticité. Les mesures de viscoélasticité sur le tissu ont d'ailleurs montré des différences, bien que non significatives (p -value $< 0,05$), entre la condition normale et les 3 puits incubés, pour le patient où la condition CSE+LPS a été testée. Par exemple, pour le module élastique G' à 1,1 Hz, mesuré sur minimum 5 localisations, les valeurs sont de respectivement : $26,7 \pm 22,5$ (N) ; $1,7 \pm 1,5$ (PBS) ; $2,6 \pm 1,0$ (CSE) et $8,0 \pm 7,4$ (CSE+LPS) Pa. Cette perte de viscoélasticité du mucus peut entraîner une baisse de sa résistance mécanique au battement du cil et donc une fréquence de battement plus élevée, permettant un transport plus rapide car la densité ciliaire est inchangée. Un des patients (symboles carrés) montre une baisse significative de la vitesse de transport entre la condition normale et l'incubation au CSE, en opposition au 4 autres patients. Ce cas particulier peut s'expliquer par la diminution de la densité de cellules ciliées avec une fréquence de battement similaire entre les deux conditions (cf corrélation entre densité de cils et vitesse du transport ci-dessous (II.3.4.2.)). Toutefois, l'effet d'une potentielle dilution du mucus avec une incubation qui remonte à 12-24h est moins marqué sur l'activité ciliaire que l'effet observé après 5 à 45 minutes suivant l'ajout d'un liquide (cf Figure 65 et discussion ci-

dessus (II.3.2.1.)). L'effet d'une modification brusque de la charge sur le tissu semble donc avoir plus d'impact sur l'activité ciliaire qu'une baisse de la viscoélasticité du mucus. Mais bien que les changements sur la fréquence de battement et la densité de cils actifs soient limités, l'incubation prolongée de 6h a induit une réorganisation globale du transport. Comme illustré sur la Figure 68B, Un vortex à l'échelle du puits entier s'observe systématiquement sur les cultures qui ont subi une incubation (N=5 patients et sur les 3 incubations (PBS, CSE, CSE+LPS)) alors que sur les puits sans incubations la formation d'un vortex global n'a jamais été observé. En condition normale le transport s'organise plutôt comme une rivière sinueuse (Figure 68A) avec des méandres, des vortex locaux et des bras qui peuvent se former. La dispersion de la vitesse de transport y est grande avec une vitesse maximum au centre des « rivières » et une vitesse nulle à l'extérieur. Cette observation s'appuie sur tous les puits observés lors du projet et pas seulement les 5 dédiés à cette expérience. La réorganisation globale du transport à la suite d'une incubation prolongée peut être causée par une ré-homogénéisation de la couche de mucus grâce à une dilution par le liquide ajouté (PBS ou milieu nutritif). L'augmentation de l'activité ciliaire qui a dû suivre les minutes voire les heures suivant le dépôt du liquide (cf discussion ci-dessus sur l'effet d'une augmentation de la charge) a dû aider et favoriser cette réorganisation.

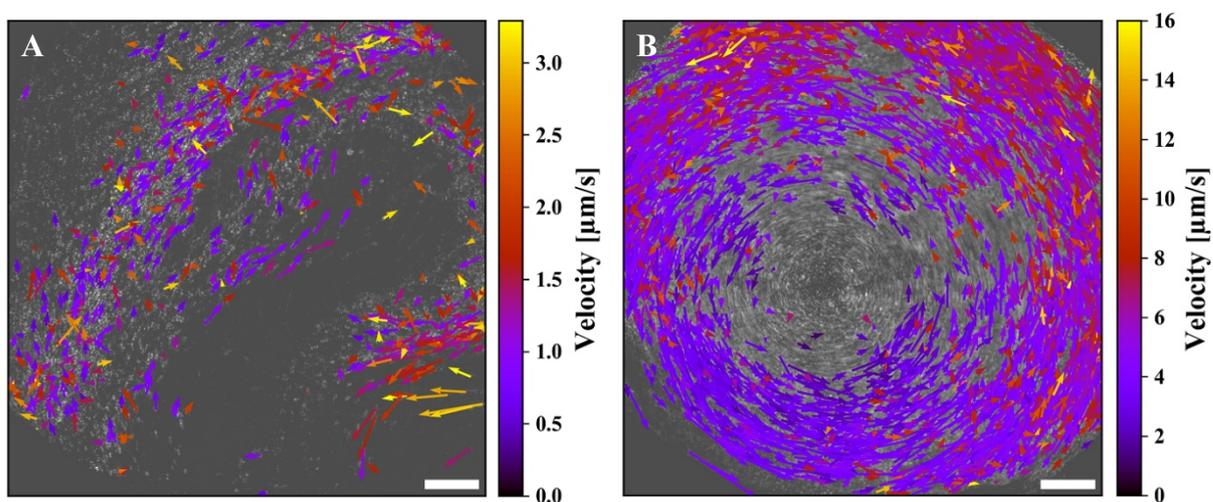


Figure 68 : Illustration de l'organisation du champ de vitesse de transport à grande échelle. Transport de la couche de mucus au centre du puits d'une culture issue d'un patient BPCO : A) n'ayant subi aucun lavage ou incubation de sa couche de mucus. B) ayant subi une incubation au PBS (500µL) pendant 6h toutes les 48h. Barre d'échelle : 200 µm.

II.3.3. Impact de la viscoélasticité du fluide

La modification de la composition et des propriétés rhéologiques du mucus est démontrée pour plusieurs pathologies respiratoires (Boucher 2019; Hill et al. 2014; Serisier et al. 2009). Afin de comprendre le lien entre les propriétés rhéologiques du mucus, l'activité ciliaire et l'efficacité de

transport du mucus, nous avons observé et analysé la densité de cils actifs, la fréquence de battement des cils et la vitesse du transport pour différentes viscoélasticités de la couche de mucus (Figure 69).

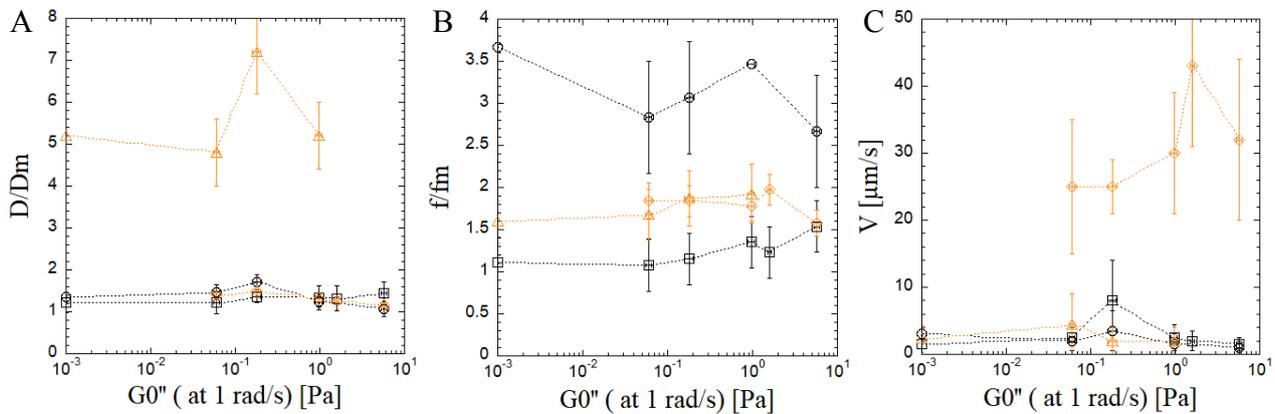


Figure 69 : Evolution de l'activité ciliaire et de la vitesse de transport du fluide en fonction de sa viscoélasticité. A) Densité de cils actifs D , normalisée par la densité mesurée avec le mucus natif D_m , en fonction du module visqueux G'' du fluide pour une fréquence d'oscillation ω de 1 rad/s, nommé G_0'' . B) Fréquence de battement des cils f , normalisée par la fréquence mesurée avec le mucus natif f_m , en fonction du G_0'' du fluide. C) Vitesse de transport du fluide V en fonction du G_0'' du fluide. Les fluides sont respectivement du milieu nutritif ($G_0''=0,001$ Pa) et des solutions de polysaccharides (mucus synthétique) de diverses concentrations de scléroglycane (Actigum). Chaque courbe représente une localisation dans un puits d'une culture, avec en noir des cultures fournies par Epithelix (2 BPCO) et en orange nos cultures avec le milieu Pneumacult (2 témoins). Les barres d'erreur sont : l'erreur de mesure pour la densité (A), l'écart type de la dispersion des mesures pour la fréquence (B) et la vitesse (C), et l'incertitude de l'ajustement en loi de puissance sur la détermination de G_0'' sur la courbe $G''(\omega)$.

La viscoélasticité de la couche de mucus est modifiée en remplaçant le mucus (cf partie méthodes II.2.1) par du liquide nutritif pour une viscosité égale à celle de l'eau (milieu nutritif), puis des solutions de polysaccharides (cf préparation du mucus synthétique partie I.2.1.) à différentes concentrations et permettant de faire varier le module élastique de perte G'' , mesuré à 1 rad/s, de 0.001 à 6 Pa (cf article 1). Nous nous sommes limités à la solution de mucus synthétique à 1% d'Actigum car la concentration de 1,5% ne permettait plus de voir un transport et il n'y avait quasiment plus de cils actifs.

La densité de cils (Figure 69A) et la fréquence de battement (Figure 69B) sont représentées normalisées par celles dans la couche de mucus avant son retrait. Les valeurs de la densité et de la fréquence sont systématiquement supérieures à 1, soit une augmentation de l'activité ciliaire en réponse à l'augmentation de la charge (50 μ L de fluide déposés). La densité surfacique de cils actifs semble passer par un même maximum autour de $G_0''=0,2$ Pa (soit pour une viscosité dynamique de 0,2 Pa.s) pour au moins deux des quatre cultures, avec un maximum environ 1.5 fois plus élevé que pour les autres fluides et qui est plus apparent pour l'une des cultures Pneumacult (triangles) dont la densité surfacique de cils actifs est particulièrement augmentée après changement du mucus. En revanche, la fréquence de battement ne présente pas de maximum et est peu affectée par le

changement de propriétés du mucus alors que pour des mesures similaires obtenues sur un épithélium de palais de grenouille avec des solutions de gomme de Xanthane, Puchelle et al. (Puchelle, Zahm, and Quemada 1987) trouvaient un maximum de la fréquence pour un fluide de module de perte G'' autour de 1 Pa. Sur la vitesse de transport (Figure 69C), qui n'est pas normalisée car la vitesse n'a pu être acquise dans le mucus faute de traceurs visibles, il n'y a pas de maximum commun aux 4 cultures analysées. L'une des cultures passe nettement par un maximum autour de 15 Pa, soit la valeur trouvée par Puchelle et al. Deux autres cultures passent par un maximum de vitesse de transport du mucus pour 0.2 Pa. Enfin, contrairement à ce qui a été observé pour le déplacement de micro-organismes dans des fluides viscoélastiques (Sabater 2017), l'élasticité ne semble pas jouer de rôle sur le transport puisqu'aucune différence nette n'est pas observée entre le liquide newtonien et les fluides viscoélastiques. Les solutions de polysaccharides appliquées passent d'un comportement visqueux dominant à élastique dominant entre la valeur G''_0 0,06 et 0,1 Pa à l'échelle macroscopique, et autour de la valeur 0,2 Pa à l'échelle microscopique (cf article 1).

Bien que des variations de l'activité ciliaire et de la vitesse du transport soient observées en fonction de la viscoélasticité du fluide, la diversité du comportement observé entre les 4 cultures analysées ne permet pas de conclusions claires pour l'instant sur l'impact des propriétés rhéologiques du fluide sur le tissu. Comme discuter précédemment, il faudrait analyser plus de cultures pour voir une tendance commune nette se dégager. De plus, la présence encore possible de mucus natif accroché aux cellules (cf partie méthodes II.2.1) peut ajouter une variabilité supplémentaire aux résultats.

II.3.4. Evolution en fonction de la maturité de la culture

II.3.4.1. L'activité ciliaire et sa répartition spatiale au cours du temps

L'un des paramètres majeurs influant sur l'organisation de l'épithélium et l'activité ciliaire est le temps de maturation de la culture, c'est-à-dire le nombre d'heures ou de jours depuis le début de la phase de différenciation des cellules. La durée de cette phase de différenciation affecte donc le pourcentage de chaque type cellulaire exprimé. Nous nous sommes intéressés à l'évolution de la densité de cellule ciliées au cours du temps et à leur répartition spatiale pour comprendre la mise en place de l'activité ciliaire et du transport au cours de la genèse des cils. Pour cela, une acquisition quasi quotidienne de l'activité ciliaire et du transport a été menée sur 5 cultures avec le milieu PneumaCult, qui est celui qui favorise le plus le développement ciliaire (Figure 71).

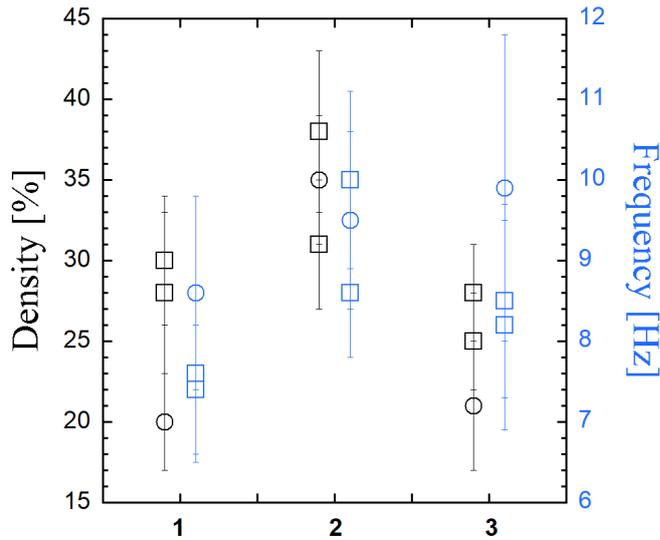


Figure 70 : Variabilité de la densité (noir) et de la fréquence (bleu) pour une culture, entre 3 puits, notés 1, 2 et 3, et 3 localisations par puits (symboles). Le cercle se réfère à la localisation au centre du puits et le carré à une zone intermédiaire entre le centre et le bord du puits. Les barres d'erreur sur la densité correspondent à l'incertitude de la mesure et celles sur la fréquence à l'écart type de la distribution des fréquences dans la zone analysée.

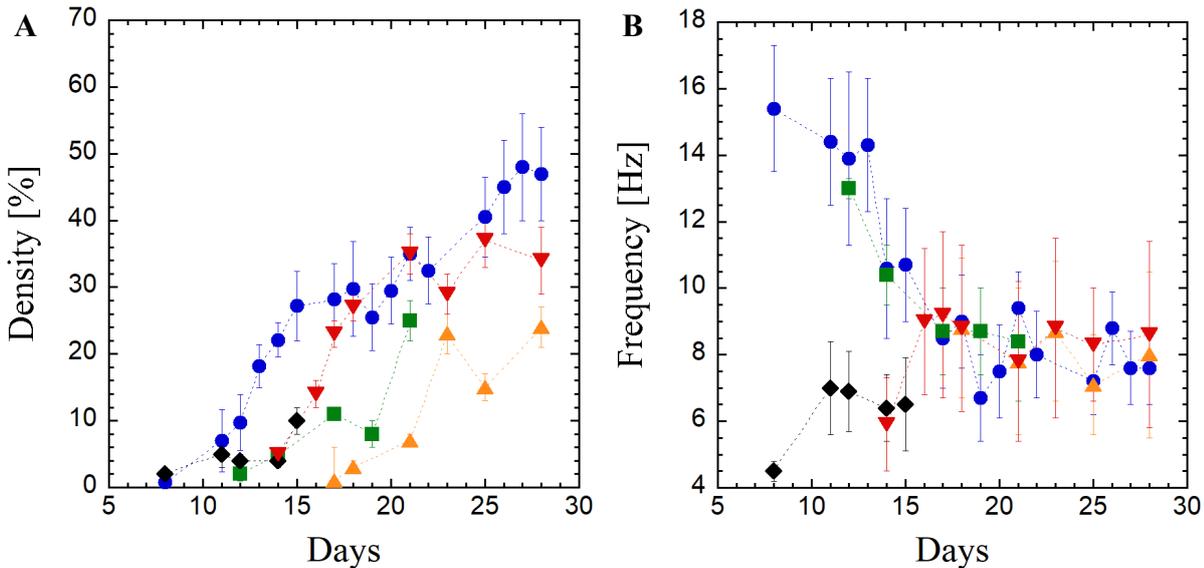


Figure 71 : Evolution de la densité de cellules ciliées actives A) et de la fréquence de battement des cils B) en fonction du jour depuis le début de la phase de différenciation cellulaire du tissu (ALI). La zone centrale d'un puits de 5 cultures (2 témoins (disques bleus et carrés verts), 2 fumeurs (losanges noirs et triangle vers le haut orange) et 1 BPCO (triangle vers le bas rouges)) est représentée. Les barres d'erreur sur la densité correspondent à l'incertitude de la mesure et celles sur la fréquence à l'écart type de la distribution des fréquences dans la zone analysée.

Sur les 5 cultures suivies, plusieurs puits (2-3) et plusieurs localisations par puits (3-5) ont été observés. Mais afin d'avoir une meilleure visibilité sur l'évolution de l'activité ciliaire sur une même zone, sans être masquée par la grande variabilité des mesures intra culture (Figure 70), seul le centre

de l'un des puits a été représenté pour chaque culture (Figure 71). On peut voir que la densité de cellules ciliées qui battent augmente avec le temps mais pas de façon continue (Figure 71A). Il y a des phases d'augmentation rapide avec une pente autour de 8% par jour et des phases de stagnation voire régression de la densité de cils actifs. Pour la fréquence on peut observer dans les premiers jours (jusqu'à J16 environ) une diminution ou une augmentation de la fréquence, puis vers J16 la fréquence se stabilise pour les 5 cultures (Figure 71B).

Il est intéressant d'observer des phases de régression dans la densité de cils actifs qui peuvent s'expliquer par la désactivation d'une partie des cellules ciliées. Il y a une différence non négligeable entre la densité de cellules ciliées présentes et celles actives. Nous avons par exemple obtenu, grâce à un marquage du tissu à la tubuline β sur une culture PneumaCult issue d'un patient BPCO, une différence significative avec un facteur supérieur à 2 à J18 entre la densité surfacique de cellules ciliées présentes sur le tissu et celle de cellules actives (Tableau 4). Cela a été observé pour 3 jours de maturité de la culture. La densité issue du marquage se réfère au puits entier tandis que le pourcentage de cellules actives est calculé à partir de 3 zones du puits prises au grossissement $\times 40$. Chaque marquage est effectué sur un puits différent de la culture mais l'acquisition de l'activité ciliaire est faite sur le même puits avant le marquage pour un jour donné. La même différence entre densité surfacique de cellules ciliées présentes et celle de cellules actives a été observé avec le milieu BEGM à J28, avec une moyenne sur 13 cultures de respectivement $12 \pm 11\%$ et $4 \pm 4\%$ ($N=13$), soit un facteur 3 de différence.

Jours depuis le début de la différenciation cellulaire	J0	J7	J14	J18
Densité surfacique de cellules ciliées, D_T [%]	0	0,04	1,12	10,3
Densité surfacique de cellules ciliées actives, D_a [%]	0	0	0,2	5,0
Rapport D_a / D_T [%]	0	0	18	49

Tableau 4 : Différence entre la densité surfacique de cellules ciliées présente sur le tissu et celle de cellules actives, pour une culture PneumaCult BPCO.

L'organisation spatiale des cellules ciliées au cours de leur développement est également intéressant à observer. Cette organisation au cours de la croissance des cellules pourrait être importante pour l'efficacité de la coordination ciliaire et l'efficacité de transport de mucus. Comme discuté dans l'état de l'art sur le couplage (partie II.1.2.2.1), le couplage hydrodynamique nécessite une distance faible entre cils pour se mettre en place. Nos observations des épithélia, quel que soit le milieu de culture utilisé, ont montré deux modes de croissance des cellules ciliées : 1) une prolifération dispersée des cellules, en cellules isolées, pour couvrir toute la surface du tissu, qui finissent par se toucher entre elles par percolation lorsque la densité devient suffisamment importante

(>30%) ; 2) une prolifération à partir d'amas de cellules ciliées qui croissent. Nous avons observé la répartition des cellules ciliées au cours de leur développement grâce à des cartographies de la densité de cellules ciliées actives (Figure 72). Il ne semble pas y avoir un mode de développement prédominant entre les deux modes de croissance des cellules ciliées, sur l'ensemble des cultures, avec le milieu BEGM (N=7) ou le milieu PneumaCult (N=8).

La densité de cils actifs n'est pas le seul paramètre qui a évolué au cours de la croissance des cils. La fréquence de battement évolue elle aussi. Cette évolution de la fréquence de battement peut être liée à la densité et la répartition spatiale des cellules ciliées sur le tissu. Pour vérifier cette hypothèse la fréquence de battement a été représenté en fonction de la densité surfacique de cils actifs. Mais aucune corrélation n'est apparue entre ces deux variables. Une deuxième hypothèse sur l'origine de l'évolution de la fréquence de battement au cours du temps est que la maturité de la culture s'accompagne d'une mise en place de la couche de mucus avec une évolution de sa viscoélasticité. La viscoélasticité du mucus peut avoir un impact sur la fréquence de battement en modifiant la résistance mécanique du mucus, comme le suggèrent nos résultats (cf ci-dessus II.3.3.) et d'autres résultats de la littérature (Puchelle, Zahm, and Quemada 1987). Une troisième hypothèse est que les cils qui commence à battre aux jours précoces (<J16) n'ont pas encore atteints leur longueur finale. Or des études ont montré l'impact de la longueur des cils ou flagelles sur la fréquence de battement (Goldstein, Polin, and Tuval 2011).

La densité surfacique de cils actifs et la fréquence de battement peuvent influencer sur la vitesse de transport du mucus et de la couche péri-ciliaire. La corrélation entre la densité surfacique de cils actifs et la vitesse du transport du mucus, comme suggérer par la littérature grâce à une modélisation (Juan et al. 2019), va être présentée et discutée ci-dessous.

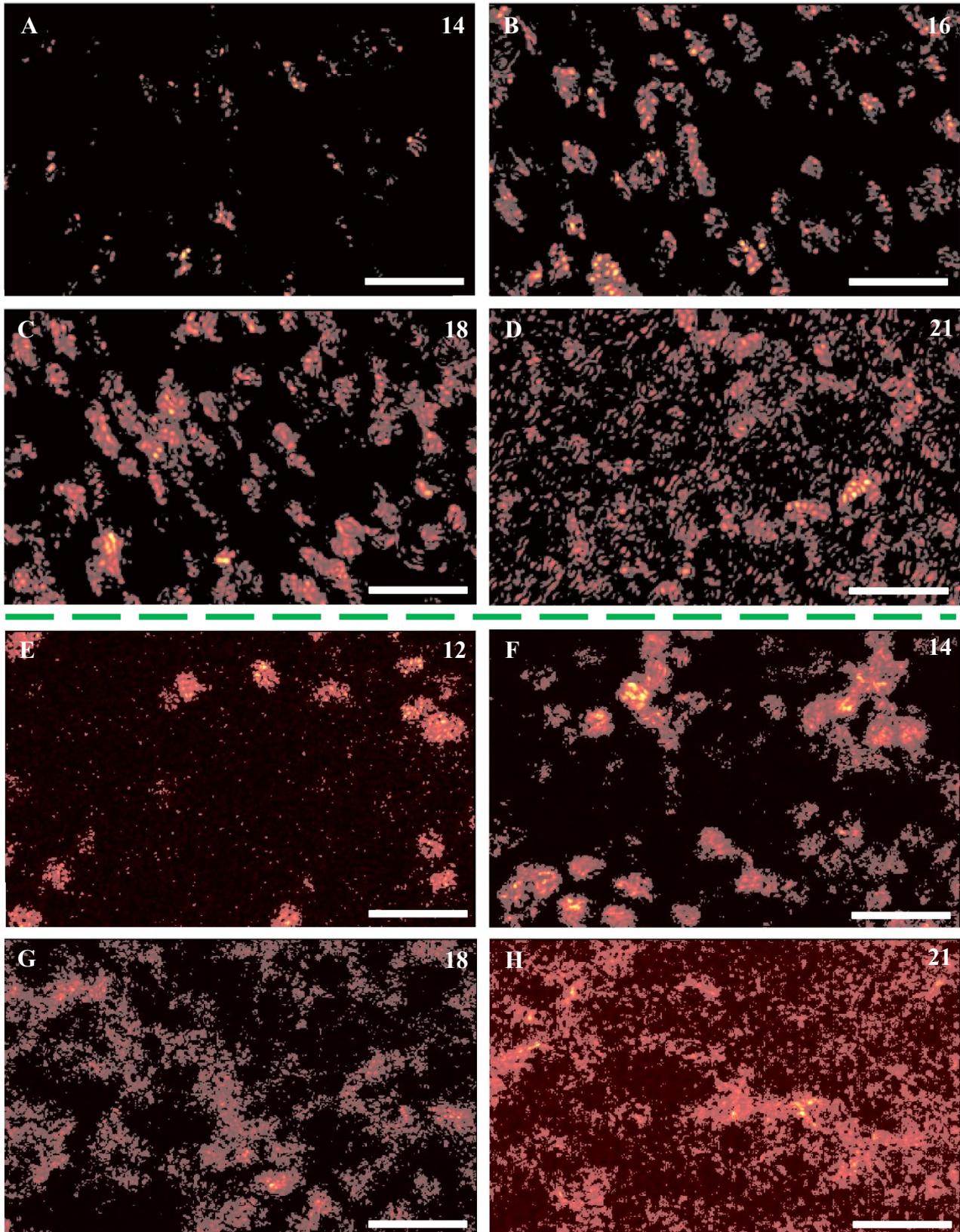


Figure 72 : Evolution de la répartition spatiale des cellules ciliées au cours du développement de l'épithélium. Le nombre en haut à droite des images représente le nombre de jours depuis le début de la phase de différenciation de la culture (mise en ALI). Les panneaux A à D représentent le centre d'un puits d'un patient BPCO avec une répartition et un développement des cellules ciliées assez homogène spatialement. La densité de cils qui battent est de respectivement : $3 \pm 1 \%$; $18 \pm 2 \%$;

$34 \pm 3 \%$ et $37 \pm 3 \%$. Les panneaux E à H représentent le centre d'un puits d'un sujet témoin avec une répartition et un développement en amas des cellules ciliées. La densité de cils qui battent est de respectivement : $8 \pm 2 \%$; $22 \pm 3 \%$; $34 \pm 4 \%$ et $35 \pm 4 \%$. Barre d'échelle : $50 \mu\text{m}$.

II.3.4.2. Efficacité du transport mucociliaire en fonction de la densité de battement

Il a été démontré par modélisation numérique que la vitesse de transport est proportionnelle à la fréquence de battement (Lee et al. 2011), bien que cela ne soit pas confirmé expérimentalement sur un épithélium de palais de grenouille (Spungin and Silberberg 1984). Pour en tenir compte, la vitesse du transport du mucus V est représentée normalisée sur la fréquence de battement f des cils en fonction de la densité de cellules ciliées actives (Figure 73). Le nombre d'acquisitions de la vitesse du transport dans la couche de mucus proprement dite étant limité (vitesse indétectable ou absence de traceurs déjà présents dans le mucus), chaque point représenté sur la Figure 73 correspond à une acquisition, c'est-à-dire une localisation sur un puits. Il peut donc y avoir plusieurs acquisitions pour une même culture (une culture = un symbole) correspondant soit à des jours d'acquisition différents, soit à des puits différents de la même culture, soit à des localisations différentes sur le même puits. Le but est de voir si une corrélation émerge entre la vitesse de transport et la densité de cils actifs indépendamment de ces paramètres. La Figure 74 montre pour un même puits l'évolution du rapport V/f en fonction du jours d'acquisition et de la densité de cils.

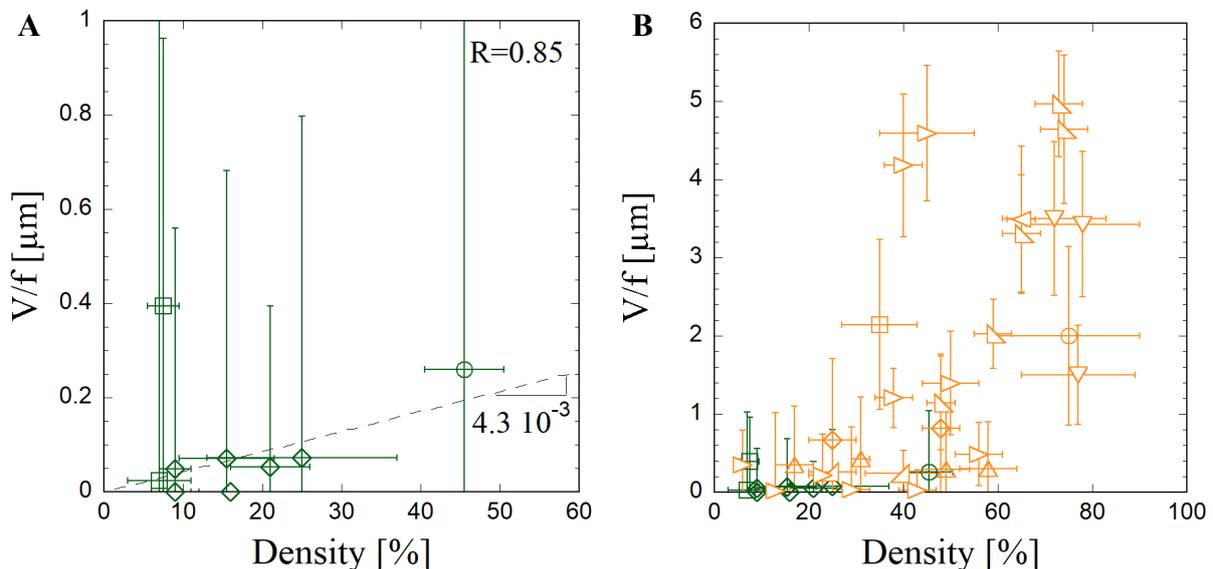


Figure 73 : Evolution de la vitesse de transport V de la couche de mucus, normalisée par la fréquence de battement des cils f , en fonction de la densité surfacique de cellules ciliées actives. A) Epithélia issus des cultures ALI avec le milieu BEGM (vert). La droite pointillée représente un ajustement linéaire appliqué aux données dont le coefficient de proportionnalité R obtenu ainsi que la pente de la droite sont indiqués sur le graphe. B) Epithélia issus des cultures ALI avec le milieu BEGM (vert) et avec le milieu PneumaCult (orange). Chaque symbole se réfère à un patient différent. Pour un même symbole chaque point correspond à une localisation sur le tissu. Les barres d'erreur représentent l'incertitude de la mesure pour la densité et la dispersion des valeurs sur la zone pour V/f .

Il semble y avoir un palier dans l'évolution de la vitesse de transport avec la densité des cils (Figure 73B), avec des vitesses nulles voire inférieures à $5 \mu\text{m/s}$ pour moins de 30% de densité de cils, et des vitesses de l'ordre de $10 \mu\text{m/s}$ au-delà qui peuvent atteindre jusqu'à $70 \mu\text{m/s}$. Une densité de cellules ciliées supérieure à 30%, plutôt entre 40 et 80 %, est ce qui est admis sur l'épithélium bronchique *in vivo* (Breeze and Wheeldon 1977; Rhodin 1966), avec des vitesses de transport correspondante de entre 5 et $80 \mu\text{m/s}$ (P. A. Vasquez et al. 2016; Foster, Langenback, and Bergofsky 1980; Juan et al. 2019). Nos mesures sont donc cohérentes avec les observations physiologiques *in vivo*.

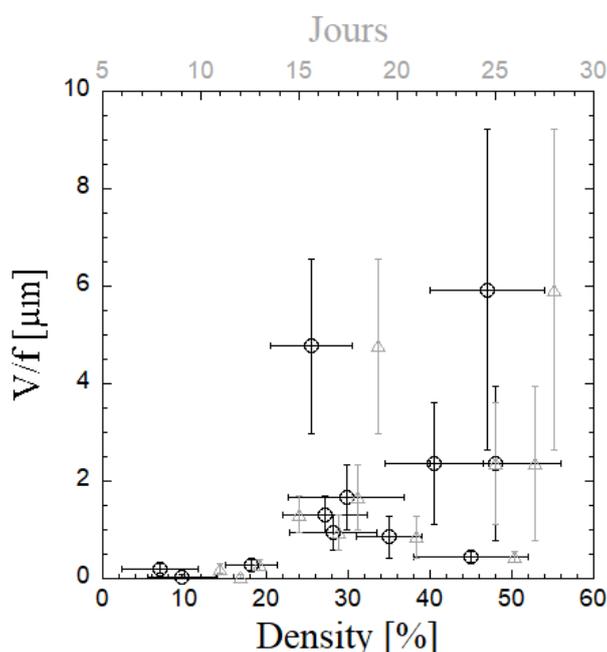


Figure 74 : Sur un même puits et une même zone, l'évolution de la vitesse de transport V de la couche de mucus, normalisée sur la fréquence de battement des cils f , est mesurée en fonction de la densité de cellules ciliées qui battent (cercles noirs) et du temps d'évolution de la culture en jours depuis le début de la différenciation (triangles gris).

On peut également observer que bien qu'une corrélation semble exister sur les cultures avec le milieu BEGM à faible densité de cils ($<50\%$), cela n'est pas le cas sur les cultures PneumaCult. L'une des raisons peut être la plus grande hétérogénéité du mucus issu des cultures PneumaCult (cf article 2) alors que le mucus BEGM est assez stable dans le temps et entre cultures (cf article 1). Mais d'autres facteurs qui ne sont pas pris en compte dans notre représentation peuvent expliquer cette grande dispersion des valeurs de la vitesse du transport, comme la distance au tissu, l'hétérogénéité du champ de transport et son évolution spatiale dans le temps. Sur la Figure 68A on peut voir que dû à l'organisation du transport en « rivière », avec une vitesse plus importante en son centre qu'à l'extérieur, la présence de méandres et de zones de point triple, la vitesse peut varier de quelques micromètres par secondes à zéro en moins de $500 \mu\text{m}$ de distance. La distance aux cellules est également importante. Sur la Figure 67C nous avons montré la diminution de la vitesse du transport

avec l'éloignement au tissu pour une interface avec une lame de verre. Nos observations en interface avec l'air, bien qu'avec une estimation seulement qualitative de la distance au tissu, semble montrer une augmentation de la vitesse du transport avec la distance au tissu (Figure 75A). Cela est particulièrement marquant et significatif lors de l'ajout d'un liquide sur la culture, par-dessus le mucus, avec une vitesse plus de 7 fois plus importante dans la couche de liquide que dans celle de mucus (Figure 75B). Il semble donc y avoir une séparation de phase et un découplage net entre les deux couches.

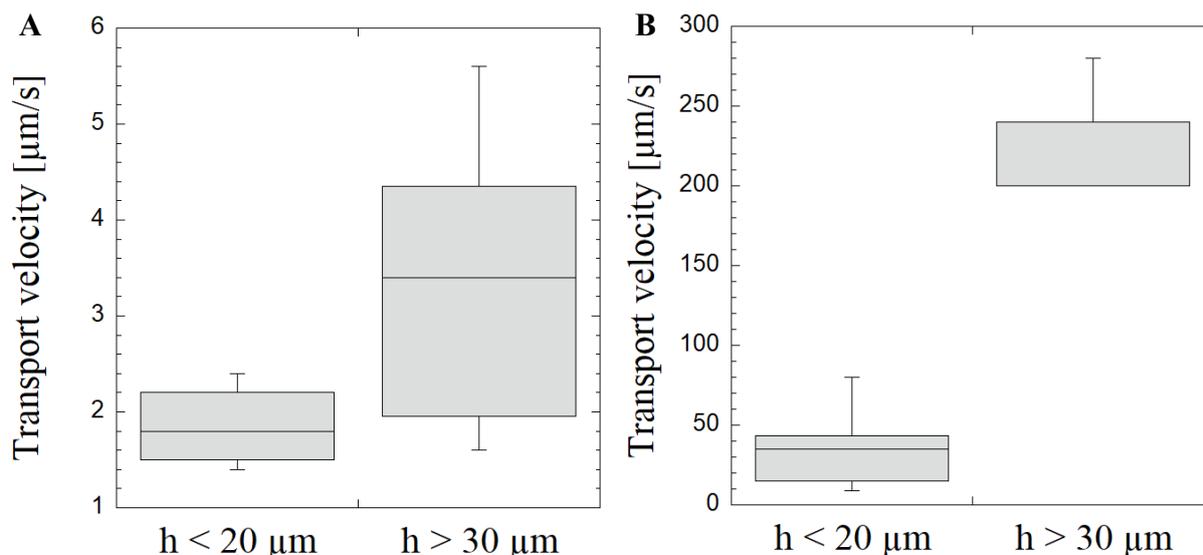


Figure 75 : Evolution de la vitesse de transport en fonction de la distance au tissu. A) Dans la couche de mucus, sans dilution ou ajout d'un liquide, la vitesse de transport est mesurée pour deux distances h aux cellules : proche des cils à $h < 20 \mu\text{m}$ et loin des cils à $h > 30 \mu\text{m}$. Les mesures correspondent à un puits issu d'un patient BPCO avec minimum 3 localisations par hauteur h . Elles sont représentées sous forme de boîtes à moustache, avec la boîte centrée sur la moyenne et de longueur équivalente à deux fois l'écart type de la distribution des mesures. Les barres d'erreur s'étendent du 1^{er} au 9^{ème} décile et la ligne dans la boîte représente la médiane. B) Idem que pour A) mais avec l'ajout de $50 \mu\text{L}$ de milieu sur le mucus sur un autre puits issu d'un autre patient BPCO.

II.3.5. Discussion

L'un des principaux points importants observés sur l'activité ciliaire et le transport du mucus face à des stimuli extérieurs est l'augmentation de la densité de cils actifs et de leur fréquence de battement lorsque la charge sur le tissu est brusquement augmentée (ajout d'un fluide). Une autre observation importante est l'effet d'une submersion prolongée du tissu par un fluide newtonien (incubation) sur le champ de vitesse du transport global. La vitesse mais aussi l'orientation globale du transport sont modifiées, et un vortex à l'échelle du puits se met en place. Il doit donc y avoir une réorganisation de l'orientation du battement et de la coordination spatiotemporelle des cils pour expliquer la modification globale du champ de vitesse du transport. Comprendre cette coordination est l'objet du chapitre suivant.

II.4. Coordination spatio-temporelle du battement ciliaire

II.4.1. Caractérisation du battement individuel des cils

Avant d'étudier la coordination spatiotemporelle entre cils, nous allons dans ce chapitre exposer les caractéristiques spatiales et temporelles du battement individuel des cils qui ont été observées.

II.4.1.1. Trajectoire spatiale des cils

Plusieurs trajectoires spatiales des cils ont été observées, vue de dessus. Nous les avons classifiées en trois groupes, comme illustré sur la Figure 76 : les trajectoires rectilignes avec une excentricité $Ecc < 0,2$ (Figure 76A) ; les trajectoires dites elliptiques avec $0,2 < Ecc < 0,6$ (Figure 76B) ; et les trajectoires dites circulaires avec $Ecc > 0,6$ (Figure 76C).

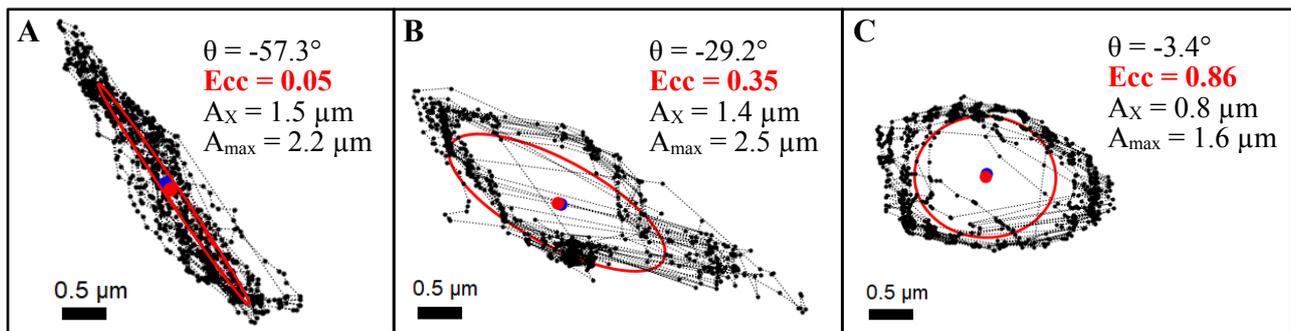


Figure 76 : Trajectoire d'un cil A) rectiligne, B) elliptique, ou C) circulaire. Les trois trajectoires sont issues d'une même zone d'acquisition ($300 \times 300 \mu\text{m}^2$) avec une densité de cils actifs de $43 \pm 3\%$, sur deux secondes.

Les trajectoires rectilignes se définissent par des phases 'stroke' et 'recovery-stroke' qui se déroulent quasiment dans la même direction. La variation au cours du cycle de la distance de la tête du cil par rapport au tissu est importante ($2-6 \mu\text{m}$), ce qui rend difficile le suivi continu de sa trajectoire (cf article 3). Ces trajectoires sont majoritaires sur les épithéliums dont la densité surfacique de cils actifs importante ($>15\%$) et notamment aux seins d'amas de cellules ciliées. Les trajectoires circulaires se définissent par une trajectoire proche du cercle, avec une asymétrie peu marquée entre la phase 'stroke' et 'recovery-stroke' et la tête du cil qui reste quasiment sur le même plan z parallèle au tissu tout le long de son cycle. Il est donc plus facile d'obtenir sa trajectoire complète avec notre méthode de suivi et d'analyse des trajectoires (cf article 3). Ces trajectoires circulaires sont souvent présentes sur les épithéliums à faible densité surfacique de cils actifs ($<10\%$) et peuvent parfois constituer la large majorité des trajectoires de ces épithéliums. On observe rarement des trajectoires circulaires sur les épithéliums à plus forte densité surfacique de cils actifs, et plutôt dans une configuration de cellule ciliée isolée, en dehors des amas de cils. Ces trajectoires circulaires ont déjà

été observées et analysées (Chilvers, Rutman, and O’Callaghan 2003; Papon et al. 2012), mais contrairement à ces études, les trajectoires circulaires ne nous apparaissent pas comme un marqueur de la présence de défauts dans la structure du cil. En effet, deux observations nous laissent penser que la forme de la trajectoire spatiale circulaire n’est pas un défaut mais une adaptation optimisée et réversible du cil à son environnement. Premièrement, ces trajectoires sont présentes dans des configurations spatiales de cellules ciliées isolées et non au sein d’amas de cellules. Deuxièmement, nous avons observé l’évolution du battement de circulaire à rectiligne avec l’évolution de la densité et de la répartition spatiale des cils au cours du temps ou encore avec la modification brusque de l’environnement (ajout d’une charge de fluide par exemple).

Nous avons observé que tous les cils d’une même cellule ciliée battent avec une trajectoire similaire, mais des trajectoires dites elliptiques peuvent se retrouver au sein de cellules ciliées au battement rectiligne, notamment à la périphérie de la cellule.

II.4.1.2. Fluctuation de la période de battement des cils au cours du temps

Les cils ne sont pas des oscillateurs fixes dans le temps, comme abordé précédemment (partie II.1.1.2.). Ils ont une trajectoire spatiale, une amplitude, une fréquence et une phase de battement qui peuvent fluctuer dans le temps et varier pour s’adapter à des modifications de leur environnement (Ma et al. 2014; D. Eshel, Grossman, and Priel 1985; Sartori et al. 2016; L. Liu et al. 2014). Nous avons également observé sur notre modèle d’épithélium bronchique humain issu de cultures ALI ces variations temporelles de la trajectoire des cils (Figure 77), et plus particulièrement de leur amplitude (Figure 77B), fréquence (Figure 77C) et phase (Figure 77D) de battement.

Sur la Figure 77A, en prenant l’exemple d’une trajectoire rectiligne, nous pouvons observer que la trajectoire spatiale du cil et sa direction peut légèrement fluctuer d’un cycle à l’autre par rapport à une valeur moyenne, représentée par l’ellipse rouge. Cette variation de l’orientation sur deux secondes (soit 16 cycles environ avec une fréquence de battement moyenne de 8 Hz), par rapport à la valeur moyenne θ , est d’environ $\pm 10^\circ$. On mesure également une variation de l’amplitude A de battement (Figure 77B), comme observée dans la littérature pour les flagelles de micro-organismes ou les cils d’épithélia de palais de grenouilles (D. Eshel, Grossman, and Priel 1985; Ma et al. 2014; L. Liu et al. 2014), d’environ $\pm 0,2 \mu\text{m}$ par rapport à la valeur moyenne (soit $\pm 10\%$ environ de l’amplitude de battement mesurée). Mais cette variation peut dépasser les 25% voire atteindre les 40-50% (D. Eshel, Grossman, and Priel 1985; Ma et al. 2014; L. Liu et al. 2014). De même, la fréquence f et la phase φ de battement d’un cil varient au cours du temps. Sur la Figure 77C, on observe la variation de la fréquence de battement d’un cil sur 2s, obtenue par un ajustement sinusoïdal sur trois périodes de battement et répété sur toute la durée du film avec un pas de deux images (soit un pas temporel de 0,004 s), avec trois paramètres libres : A , f et φ . Cette variation de la fréquence est d’en moyenne $\pm 0,3 \text{ Hz}$, sur 2s, par rapport à la fréquence moyenne sur la durée du film, et n’excède pas $\pm 0,6 \text{ Hz}$ (soit respectivement $\pm 4\%$ et $\pm 9\%$ par rapport à la fréquence moyenne). Pour la phase φ

(Figure 77D), le mesure au cours du temps est obtenue avec le même procédé que pour la variation de la fréquence, mais dans ce cas, l'ajustement sinusoïdal est réalisé avec seulement deux paramètres libres : A et φ . La fréquence f est fixée pour éviter que la forte interdépendance entre f et φ ne biaise les variations de φ au cours du temps. La variation de la phase est très différente d'un cil à un autre, et pour un même cil, elle peut présenter un profil stable (variations $< 0,1$ rad) suivi de brusques variations ($> 0,7$ rad soit près de $\pi/4$), comme l'illustre la Figure 77.

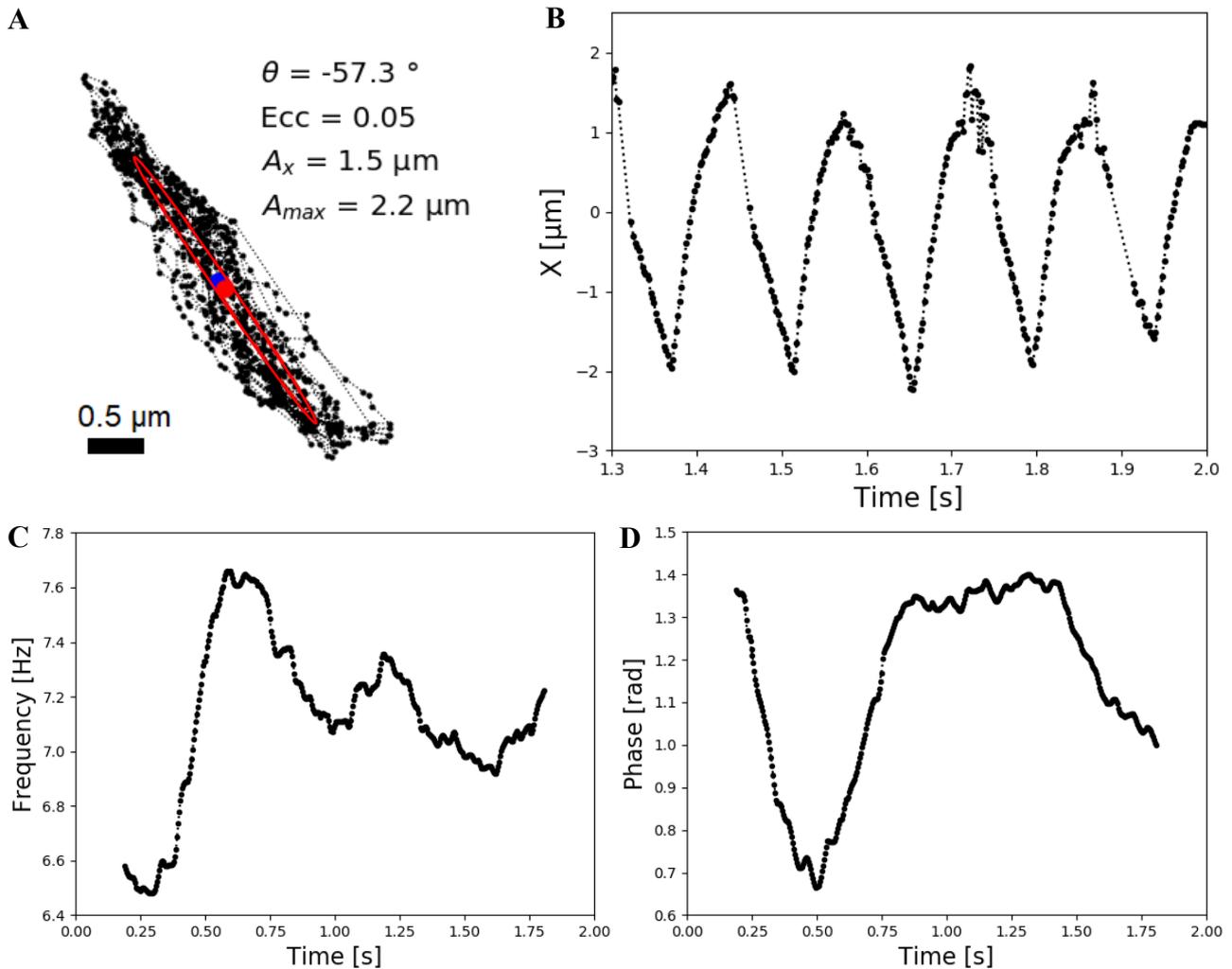


Figure 77 : Variation des paramètres de battement du cil au cours du temps. A) Trajectoire spatiale d'un cil sur 2 secondes. θ , Ecc , A_x et A_{max} se réfèrent respectivement à l'orientation de battement, l'excentricité de la trajectoire, l'amplitude de battement déterminée par l'ajustement sinusoïdal et l'amplitude maximale du cil. B) Trajectoire temporelle du cil, réorientée sur son axe principal de battement X. C) Variation de la fréquence de battement et D) de la phase, au cours des 2 secondes, obtenus par l'ajustement sinusoïdal de $X(t)$ sur un intervalle glissant de 3 périodes de battement. Pour les variations temporelles de la phase, (D) la fréquence est fixée pour l'ajustement).

Ces variations soulignent les capacités adaptatives du battement ciliaire. La fréquence et la phase peuvent être modulées par la réduction ou l'allongement de la phase 'stroke' et/ou 'recovery-stroke' mais aussi par le temps de pause que marque le cil entre ces deux phases (Gheber and Priel

1990). Sur la Figure 77B, on peut observer cet allongement du temps de pause entre les phases ‘stroke’ et ‘recovery-stroke’ (partie haute de la sinusoïde) avec un nombre de points plus important au niveau de la crête sur l’intervalle 1,55-2s par rapport aux cycles précédents.

Ces fluctuations temporelles de la trajectoire spatio-temporelle des cils expliquent la difficulté de l’analyse et de l’interprétation de la coordination et du couplage entre cils dans les systèmes biologiques. L’étude de la coordination du battement des cils fait l’objet du chapitre suivant.

II.4.2. Coordination intra cellules ciliées, types et évolution des mécanismes de battement

Grâce à notre méthode de suivi individuel des packs de cils (<10 cils) au sein des cellules et l’identification des cellules ciliées grâce à un algorithme de groupement (cf article 3), nous avons étudié la coordination spatio-temporelle du battement ciliaire à l’échelle de la cellule ciliée.

Une première approche pour étudier cette coordination est le calcul d’une fonction de corrélation F_c sur des paires de cils au sein d’une même cellule (cf article 3). La fonction F_c corrèle la position des deux trajectoires de la paire, projetée sur leur axe principal de battement X , en fonction du délai temporel τ , telle que :

$$F_c(\tau) = \frac{\langle X_1(t) X_2(t + \tau) \rangle}{\sqrt{\langle X_1(t)^2 \rangle \langle X_2(t + \tau)^2 \rangle}}$$

avec $X_1(t)$ et $X_2(t)$ la position à l’instant t sur l’axe X_1 et X_2 de respectivement la première et la deuxième trajectoire de la paire. Afin de quantifier la coordination spatio-temporelle pour chaque paire, nous avons déduit de la fonction $F_c(\tau)$ le niveau de corrélation maximum de la courbe $C_m = \text{Max}(F_c)$ et le délais τ_c correspondant à la valeur de C_m , converti en déphasage $\Delta\Phi = 2\pi\tau_c/T_c$, avec T_c la période de la fonction $F_c(\tau)$, estimée comme la moyenne de la période de battement des deux trajectoires de la paire.

Ce calcul de la fonction $F_c(\tau)$, pour chaque paire de trajectoires au sein d’une même cellule, nous a permis de démontrer que tous les cils d’une même cellule ne battent pas nécessairement en phase et que plusieurs déphasages entre sous-ensembles de cils peuvent exister. Nous avons ainsi pu observer et définir 4 types de battement au sein des cellules au battement rectiligne : 1) tous les cils qui battent en phase ; 2) 2 blocks de cils en quadrature de phase qui se divisent parallèlement à l’axe principal de battement de la cellule ; 3) 3 à 5 blocks de cils en déphasage, qui forme une onde métachronale à l’échelle de la cellule ciliée ; et 4) battement désordonné, c’est-à-dire que des blocks de cils en phase bien définis sont difficilement discernable à l’œil. A ces quatre types de battement, s’ajoute le cas des cellules au battement circulaire ou elliptique, dont le battement des cils est soit en phase soit avec un léger déphasage de cil à cil au sein de la cellule. La Figure 78 représente la fonction

$F_c(\tau)$, pour toutes les paires de trajectoires au sein de la cellule, pour les 4 types de battement rectiligne définis ci-dessus. Les cellules choisies pour cette illustration ont été sélectionnées en raison de la bonne définition du type de battement et de sa stabilité sur les 2s du film. La fonction $F_c(\tau)$ est calculée sur tout l'intervalle des trajectoires (2s maximum) avec un temps de retard τ variant de 0 à 0,2 s, avec un pas de 0,002s. Pour limiter le bruit sur les courbes $F_c(\tau)$ et éliminer les trajectoires avec un échantillonnage temporel faible, seuls les points avec $F_c(\tau)$ calculé sur un minimum de 50 correspondances entre $X_1(t)$ et $X_2(t + \tau)$ sur l'ensemble des instants t (toutes les 0,002s) sont représentées. Les courbes rouges représentent les paires en phase à $\pm\pi/4$, celles en bleus correspondent à des paires en quadrature de phase à $\pm\pi/4$, et celles en magenta représentent les paires en opposition de phase $\pm\pi/4$. Les courbes noires se réfèrent à des paires pour lesquelles le maximum de coordination est inférieur à 0,5 : $Max(F_c) < 0,5$. Pour toutes les autres courbes, $Max(F_c) > 0,5$. Les distributions de $Max(F_c)$ et du déphasage $\Delta\Phi$ correspondant, pour chaque paire de trajectoire au sein de la cellule, sont représentées sur la Figure 79.

Pour la cellule dont l'ensemble des cils battent en phase (Figure 78A), on peut observer que la majorité des paires de trajectoires ont un maximum de la fonction de corrélation $F_c(\tau)$ supérieur à 0,6 (moyenne à 0,65) (Figure 78A et Figure 79A) et un maximum de cette fonction pour τ presque nul (Figure 78A), soit un déphasage $\Delta\Phi$ proche de 0 rad (Figure 79E). Les courbes $F_c(\tau)$ présentant un niveau de corrélation $Max(F_c) < 0,5$ sont dues à la contribution de trajectoires mal suivies et/ou échantillonnées, qui ont échappées à nos nombreux tris sur les trajectoires conservées pour l'analyse de la coordination (cf article 3). Les paires en déphasage $\Delta\phi > \pi/4$ sont dues à la contribution des trajectoires en périphérie de la cellule, dont le battement peut être légèrement désolidarisé du reste des cils de la cellule. Néanmoins, sur l'histogramme (Figure 79E), on observe que la probabilité de $\Delta\phi = 0 \text{ rad}$ est deux fois plus probable que pour $\Delta\phi = 1,26 \text{ rad}$ (Figure 79E). La cellule dont les cils battent selon 2 blocks en quadrature de phase, présente un niveau de corrélation $Max(F_c)$ moyen entre les paires légèrement plus faible (0,62). La distribution statistique de $\Delta\phi$ (Figure 79F) présente deux maxima : $\Delta\phi = 0 \text{ rad}$ et $\Delta\phi = 1,23 \text{ rad}$, quasiment équivalents, ce qui confirme la présence de 2 blocks. Mais cette observation est identique pour la distribution de $\Delta\phi$ au sein de la cellule à 5 blocks (Figure 79G). Cela s'explique par la succession de blocks en phase et en quadrature de phase au sein de cette cellule à 5 blocks, ce qui donne 3 blocks en phase et 2 blocks en quadrature de phase au total. La cellule au battement désordonné ne présente pas un niveau de corrélation $Max(F_c)$ nettement plus faible que les autres motifs (moyenne à 0,57, Figure 78D et Figure 79D), malgré une hypothèse initiale d'un niveau de $Max(F_c)$ plus faible pour la cellule désordonnée. Le battement ciliaire entre cils de ces cellules n'est donc pas complètement dé-corrélé. Cependant, il s'agit de la seule à ne pas avoir une probabilité de $\Delta\phi = 0 \text{ rad}$ majoritaire (Figure 79H). C'est la probabilité $\Delta\phi = 1,24 \text{ rad}$ qui est majoritaire, et contrairement aux autres types de battement, deux autres maxima de probabilité sont observés $\Delta\phi = 0,62 \text{ rad}$ et $\Delta\phi = 2,48 \text{ rad}$, avec des valeurs de probabilités inférieures à 0,1 néanmoins.

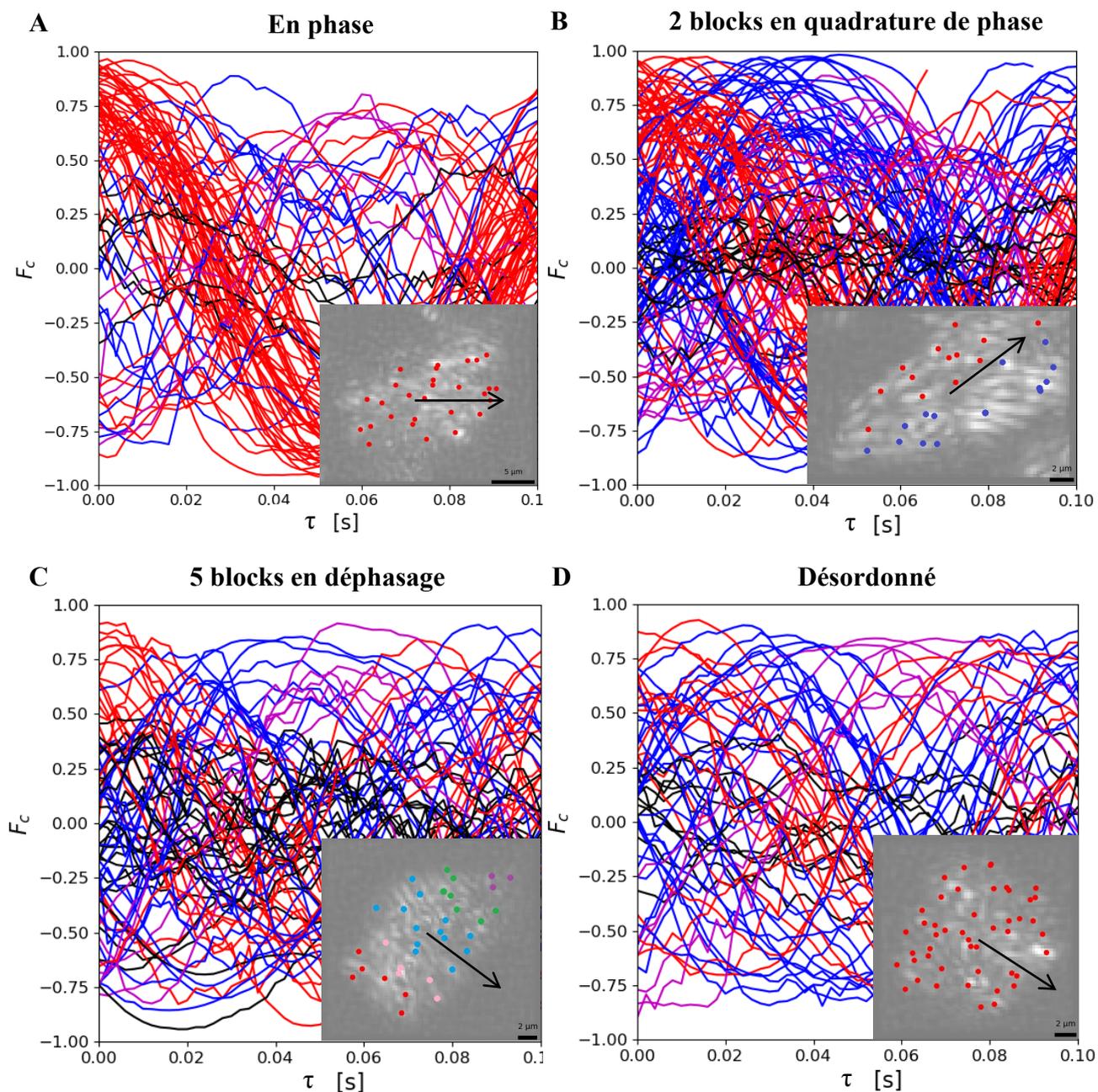


Figure 78 : Illustration des 4 types de battement des cils, observés au sein d'une même cellule ciliée : A) tous les cils sont en phase, B) subdivision en 2 blocks de cils en quadrature de phase, C) subdivision en 3 à 5 blocks en déphasage avec son voisin, et D) battement désordonné sans émergence de sous-ensembles de cils bien délimités. La fonction de corrélation entre paire de cils F_c est représentée en fonction du temps de retard τ entre la position des 2 cils de la paire, pour toutes les paires possibles au sein de la cellule. La couleur des courbes représente respectivement : en rouge les paires quasiment en phase (déphasage $\Delta\phi < \pi/4$), en bleu les paires quasiment en quadrature de phase ($\pi/4 < \Delta\phi < 3\pi/4$), en magenta les paires quasiment en opposition de phase ($3\pi/4 < \Delta\phi < \pi$), et en noir les paires avec un niveau de corrélation maximum inférieur à 0,5. En encart, sont représentées les positions du barycentre de chaque trajectoire au sein de la cellule. La flèche indique l'orientation moyenne de battement au sein de la cellule et les groupes de couleur représentent des sous-ensembles de cils battant en phase (sauf pour la cellule dite « désordonnée » où aucun sous-ensemble n'a pu être identifié). Barre d'échelle : $5 \mu\text{m}$ pour A) et $2 \mu\text{m}$ pour B) à D).

La distribution statistique de $Max(F_c)$ et de $\Delta\phi$ de l'ensemble des paires de trajectoires au sein d'une même cellule met en évidence les difficultés à automatiser la détermination du type de battement. Les critères de tri sont difficiles à déterminer car il n'y a pas de différences suffisamment tranchées entre les 4 types de battement illustrés.

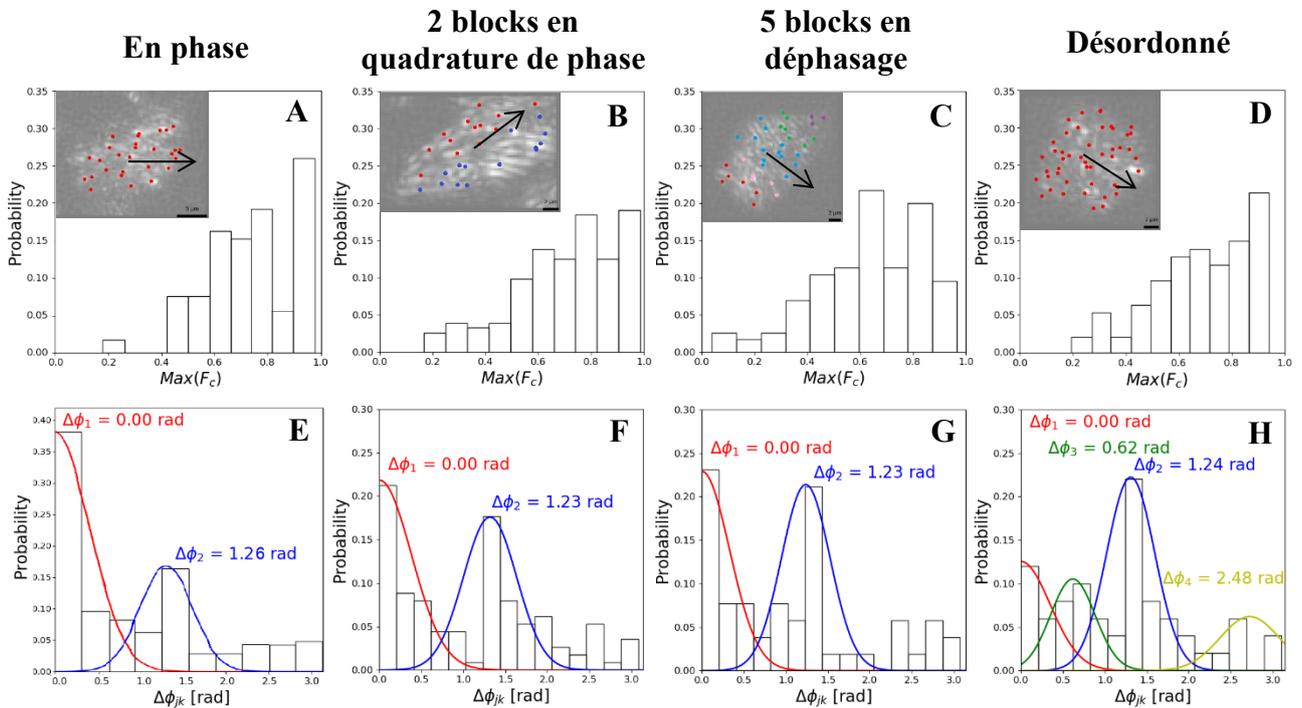


Figure 79 : : Distribution du niveau maximum de corrélation $Max(F_c)$ (A à D) et du déphasage $\Delta\phi$ (E à H) pour les 4 types de battement au sein d'une même cellule. Les valeurs de $Max(F_c)$ et $\Delta\phi$ sont déterminées à partir de la fonction de corrélation $F_c(\tau)$ (cf Figure 78) pour chaque paire de cils au sein d'une cellule. A à D) Le niveau de corrélation maximum moyenné sur l'ensemble des couples au sein de la cellule est de respectivement : 0,65 ; 0,62 ; 0,52 ; et 0,57. En encart sont rappelés les barycentres des trajectoires, l'orientation moyenne de battement et les sous-ensembles de cils identifiés. E à H) Les déphasages $\Delta\phi$ les plus probables (une couleur = une probabilité) pour chaque cellule sont soulignés par les courbes gaussiennes dont la valeur maximum est indiquée sur les graphes.

L'automatisation de la détermination du type de motif de battement des cellules ciliées est possible pour les cellules ciliées au battement circulaire ou elliptique grâce à l'excentricité moyenne des trajectoires au sein de la cellule, la moyenne du déphasage entre les phases sur l'axe X et l'axe Y des trajectoires, ou encore l'écart type de l'orientation de battement des trajectoires au sein de la cellule ($>50^\circ$ pour les cellules au battement circulaire). Mais la détection du motif de déphasage au sein des cellules au battement rectiligne est plus complexe. Afin d'automatiser cette détection, nous avons essayé plusieurs combinaisons entre les différents paramètres de chaque paire, que sont : le déphasage $\Delta\Phi$, le maximum de la fonction de corrélation $Max(F_c)$, la différence de fréquence de battement entre les 2 trajectoires de la paire, la différence d'orientation de battement, ou encore l'écart de la paire ΔY sur l'axe Y perpendiculaire à l'axe principal moyen de battement des cils de la cellule.

Le type de battement est essentiellement relié au déphasage entre sous-ensembles de cils, qui se divisent préférentiellement parallèlement à l'orientation de battement de la cellule. Par conséquent, les paramètres $\Delta\Phi$ et ΔY sont ceux qui nous ont semblés les plus prometteurs. La Figure 80A-D montre la dispersion de ΔY en fonction de $\Delta\Phi$ pour chaque paire au sein d'une cellule, sur les 4 cellules représentant les 4 types de battement illustrés ci-dessus. Le résultat de l'algorithme de regroupement 'Mean Shift' (cf article3), appliqué sur cette dispersion normalisée (par π pour $\Delta\Phi$ et par la longueur de la cellule sur l'axe Y pour ΔY), est présenté sur la Figure 80E-H, dans le but d'automatiser la détection des sous-ensembles de cils et donc du type de battement.

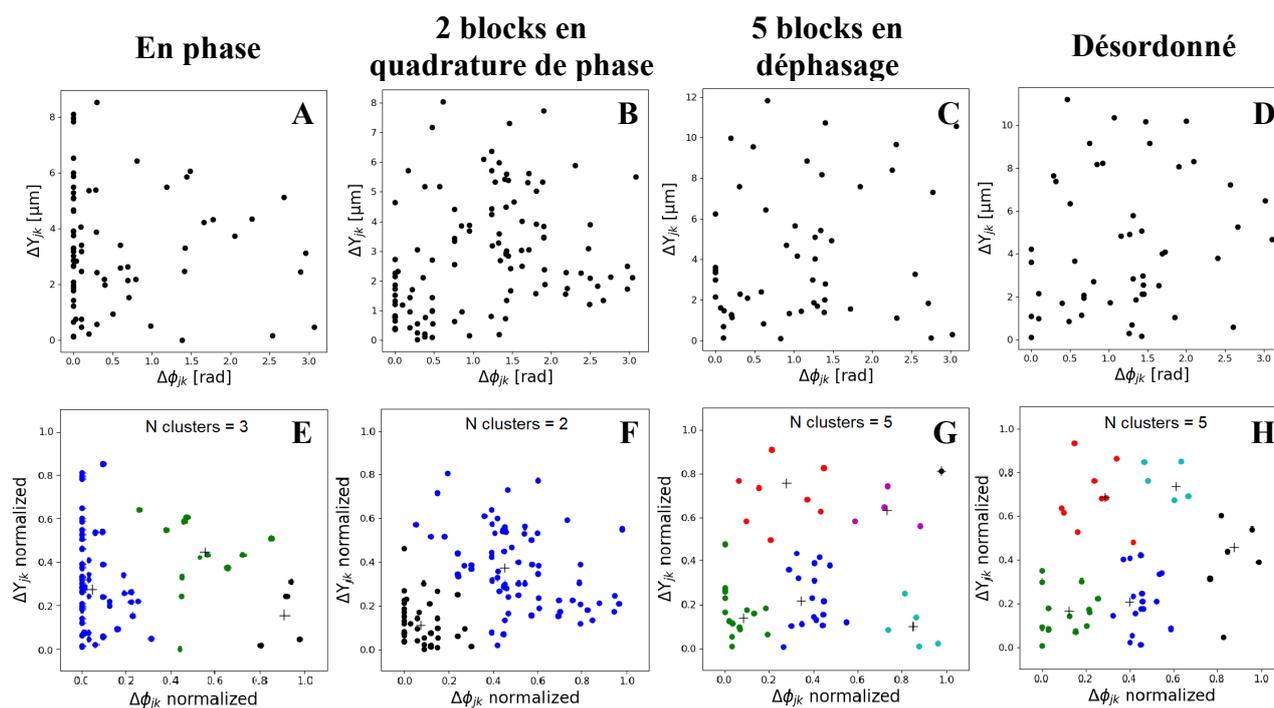


Figure 80 : A à D) Représentation de la distance entre les paires ΔY , sur l'axe Y perpendiculaire à la direction moyenne de battement de la cellule, en fonction du déphasage $\Delta\phi$ de la paire. Les données pour chaque paire au sein d'une cellule sont représentées, pour les 4 cellules illustrant les 4 types de couplage intracellulaire. E à H) Résultats de l'algorithme de regroupement 'Mean Shift' appliqué sur les données $\Delta Y(\Delta\phi)$ normalisées, afin d'automatiser la détection des sous-ensembles de cils au sein des cellules et déterminer son type de motif de déphasage. Chaque groupe identifié par l'algorithme est représenté par une couleur différente et le nombre de groupe total détecté est indiqué sur les graphes.

Pour la cellule aux cils qui battent en phase (Figure 80A et E), on observe déjà un résultat de l'algorithme de regroupement à 3 groupes détectés, divisé selon $\Delta\Phi$. Nous nous attendions à un résultat à un seul groupe détecté, très resserré autour de $\Delta\Phi = 0$, pour une cellule avec tous les cils en phase. Mais la présence de quelques cils en déphasage à la périphérie de la cellule, déjà mis en évidence sur la distribution de $\Delta\Phi$ (Figure 79E), explique ce résultat cohérent avec la dispersion de $\Delta Y(\Delta\Phi)$. Néanmoins, la comparaison du nombre de points $\Delta Y(\Delta\Phi)$ entre les groupes détectés, souligne le déséquilibre entre les 3 groupes avec le premier groupe autour de $\Delta\Phi = 0$ plus de 2 fois

plus nombreux que le deuxième groupe autour de $\Delta\Phi = \pi/2$, comme observé également sur la distribution de $\Delta\Phi$ (Figure 79E). Ce déséquilibre avec une nette dominance du groupe autour de $\Delta\Phi = 0$ peut permettre de trancher sur le type de motif de la cellule en faveur d'un battement en phase. Pour la cellule à 2 blocks en quadrature de phase (Figure 80B et F), le résultat de l'algorithme de regroupement 'Mean Shift' donne bien 2 groupes détectés, mais dont la délimitation est contestable. Nos yeux semblent détecter 2 groupes bien denses, l'un autour de $\Delta\Phi = 0 \text{ rad}$ et $\Delta Y < 3 \mu\text{m}$ et l'autre autour de $\Delta\Phi = \pi/2 \text{ rad}$ et $\Delta Y > 2 \mu\text{m}$. La contribution de trajectoires mal suivies ou échantillonnées, peut expliquer la présence de points en dehors de ces 2 groupes très denses qui gêne la précision du résultat de l'algorithme de regroupement. En ajustant le paramètre 'bandwidth' qui correspond à la distance moyenne entre les points et le noyau du groupe, il est possible de détecter ces deux groupes avec un total de 5 groupes détectés. Mais la modification du paramètre 'bandwidth' pour chaque cellule pose le problème de l'automatisation de la détection. Il faudrait déterminer un paramètre de qualité des groupes détectés et appliquer l'algorithme 'Mean Shift' pour plusieurs 'bandwidth' et prendre le résultat donnant le meilleur paramètre de qualité. Pour la cellule à 5 blocks en déphasage (Figure 80C et E) le résultat de l'algorithme de groupement semble satisfaisant, avec 5 groupes détectés relativement équilibrés entre eux, séparés selon $\Delta\Phi$ et ΔY . L'automatisation semble donc possible mais on peut voir que la cellule au battement désordonnée (Figure 80D et H) donne un résultat très similaire à la cellule à 5 blocks en déphasage, ce qui souligne la difficulté de discerner automatiquement le motif de battement de la cellule. De plus, comme observé sur la Figure 79C et D, la distribution de $Max(F_c)$ ne permet pas non plus de discerner les 2 motifs. L'automatisation de la détection du motif de battement au sein des cellules au battement rectiligne n'est donc pas encore au point et nécessiterait l'amélioration de la qualité des trajectoires analysées et le calcul d'un paramètre de qualité sur le résultat de l'algorithme de regroupement.

L'observation de ces différents types de battement au sein des cellules ciliées nous a également permis de constater qu'ils peuvent évoluer au cours du temps. Une même cellule peut varier d'un battement avec tous les cils en phase, à un battement à 2, 3, 4 ou 5 blocks en déphasage, et inversement, sur seulement 3 à 4 périodes de battement. La fonction de corrélation $F_c(\tau)$ nous permet difficilement de rendre compte de ces variations en l'appliquant sur seulement 3 périodes. En raison de l'échantillonnage temporel variable de nos trajectoires, la statistique est trop faible et ne permet pas d'obtenir des valeurs fiables pour $F_c(\tau)$ (minimum 25 correspondances requise soit $\pm 10\%$ d'erreur tolérés). Une approche utilisant les paramètres, notamment la phase, issus de l'ajustement sinusoïdal appliqué sur 3 périodes toutes les 2 images du film (0,004s), est plus appropriée pour observer les variations temporelles du couplage.

La Figure 81A-C représente la cartographie de la phase de chaque trajectoire au sein d'une cellule ciliée, à 3 instants t espacés de 6 périodes de battement. L'exemple d'une cellule dont le motif de battement ne varie pas sur les 2s du film (encadrée en vert) et celui d'une cellule dont le motif varie (encadrée en jaune) sont représentés. On peut observer que la phase de chaque trajectoire n'évolue pas entre les 3 instants t illustrés au sein de la cellule encadrée en vert tandis que pour celle

encadrée en jaune une évolution est observée sur la partie gauche de la cellule. Cette évolution au cours du temps du déphasage entre les groupes de cils au sein de la cellule est mise en évidence par le calcul du déphasage $\Delta\varphi(t)$ de paires de trajectoires. La Figure 81E montre le résultat de $\Delta\varphi(t)$ pour deux paires, dont la localisation est indiquée sur la Figure 81D. La paire verte est au sein de la cellule dont le motif de battement ne varie pas sur 2s et la paire jaune est au sein de celle dont le motif varie. On observe que le déphasage est relativement constant sur 1,6s pour la paire verte, mise à part une variation cyclique (de l'ordre de 0,1 rad) correspondant à la période du battement. En revanche, pour la paire jaune, on constate une grande évolution de $\Delta\varphi(t)$, avec près de 1 rad en 0,4s, alors que sur l'intervalle 0,7-1,1s le déphasage varie peu. Cette transition entre les différents types de couplage pourrait se faire par l'ajustement et la variation du temps de pause entre la phase 'stroke' et 'recovery-stroke' de sous-ensembles de cils au sein de la cellule comme observé par Gheber et Priel (Gheber and Priel 1990).

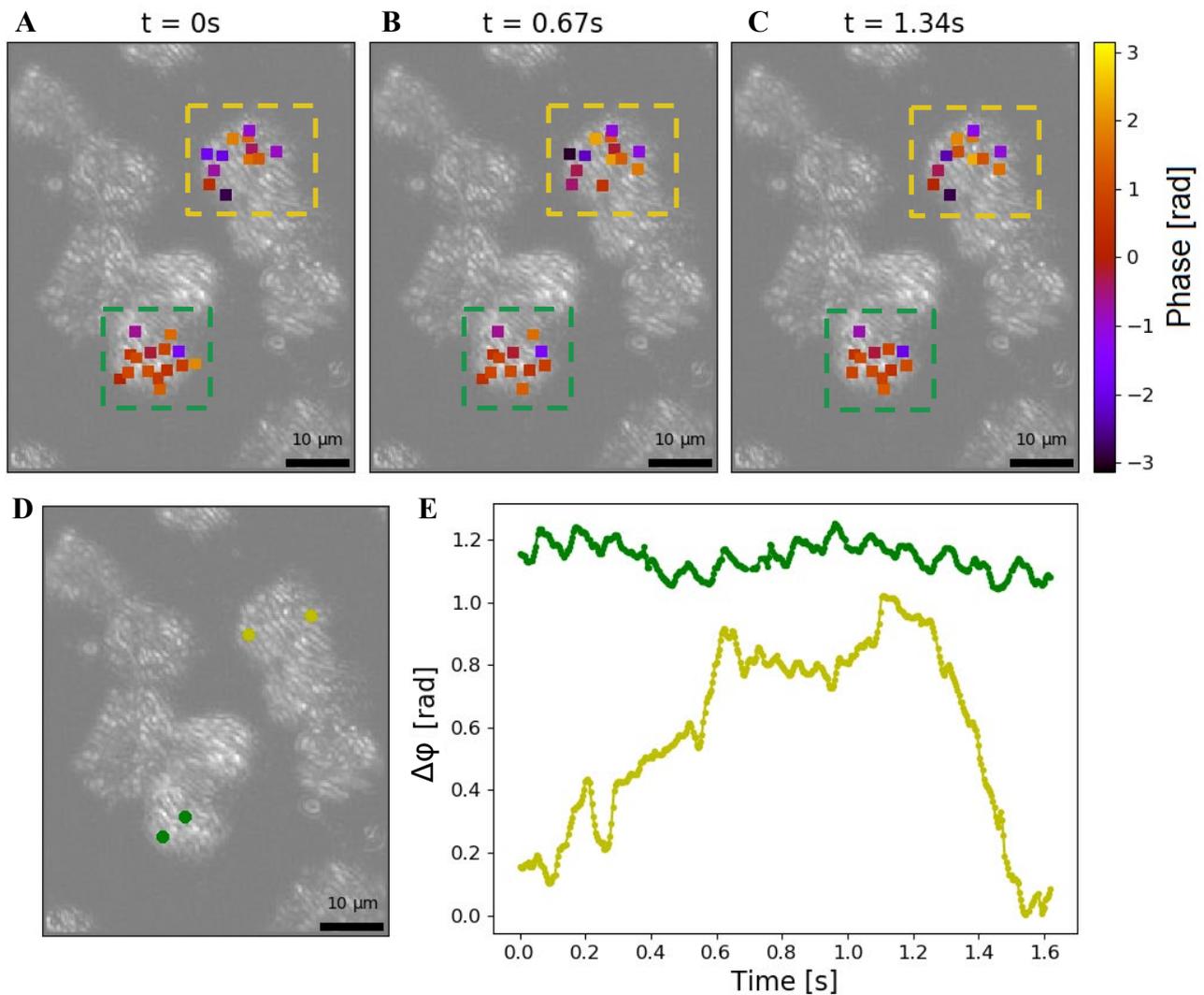


Figure 81 : Evolution de la phase des trajectoires au cours du temps et du type de couplage au sein de la cellule ciliée. A à C) Cartographie de la phase des trajectoires (code couleur) pour 3 instants t espacés d'environ 6 périodes de battement : A) $t = 0\text{s}$; B) $t = 0,67\text{s}$; et C) $t = 1,34\text{s}$. La phase a été déterminée par l'ajustement sinusoïdal des trajectoires sur 3 périodes toutes les 2 images sur les 2 s du film. La cellule encadrée en vert est une cellule dont le type de couplage intracellulaire est fixe

sur les 2s du film et celle encadrée en jaune est une cellule dont le type de couplage varie. Barre d'échelle : 10 μm . D) Position du centre de la trajectoire pour 2 paires : en vert une paire dans la cellule au type de couplage fixe, et en jaune une paire dans la cellule dont le type de couplage varie. E) Déphasage $\Delta\phi$ au cours du temps pour les 2 paires illustrées sur le panneau D).

La phase déterminée par l'ajustement sinusoïdal et le déphasage entre paire au sein d'une même cellule permettent de mettre en évidence les variations du type de battement au cours du temps et mettent en évidence une dynamique qui mériterait d'être étudiée. La cartographie de la phase des trajectoires devrait permettre également de déterminer le type de motif de battement d'une cellule ciliée à chaque instant t , en identifiant des sous-ensembles de trajectoires en phase. L'application de l'algorithme 'Mean Shift' sur 3 paramètres : la position (x,y) du centre des trajectoires et leur phase ϕ , a été testée pour automatiser la détermination du type de couplage intra-cellulaire. Mais le bruit présent sur la détermination de la phase, l'absence de trajectoire sur des parties des cellules (cf Figure 81A-C), et le résultat contestable de l'algorithme utilisé pour définir les groupes de trajectoires, comme discuté précédemment sur les paramètres issus de la fonction de corrélation $F_c(\tau)$, ne permettent pas en l'état d'automatiser cette détermination. Une amélioration de la méthode de suivi et de tri des trajectoires (cf article 3) pourrait permettre d'obtenir plus de trajectoires fiables par cellule. Cela permettrait également d'améliorer l'échantillonnage temporel des trajectoires afin de conserver une détermination de la phase, par l'ajustement sinusoïdal, fiable pour chaque instant t .

Cette étude de la coordination spatio-temporelle du battement, à l'échelle de la cellule ciliée, nous a montré le bon niveau de couplage du battement au sein d'une même cellule, qui peut être dû au réseau de filaments entre les bases des cils au sein d'une même cellule (couplage basale, cf partie II.1.2.2.1). La présence de différents types de déphasages entre sous-groupes de cils au sein de la cellule (tous en phase, 2 blocks en quadrature de phase, 3 blocks ou plus en déphasage qui forment une onde métachronale à l'échelle de la cellule ciliée, battement désordonné) et leurs évolutions au cours du temps, ont pu être démontrées. Le bon niveau global de coordination entre cils au sein d'une même cellule établi, l'étude de la coordination inter cellule ciliée va être l'objet du chapitre suivant.

II.4.3. Coordination inter cellules ciliées

La coordination ciliaire entre cellules ciliées peut être explorée à plusieurs échelles : d'une échelle de 2 à 3 cellules ($\sim 50\mu\text{m}$) à celle de plus d'une dizaine voire centaine de cellules (100-1000 μm). Elle peut également s'étudier, pour une même échelle, en fonction de la configuration spatiale des cellules ciliées, c'est à dire en fonction de la distance entre les cellules ciliées ou encore de leur alignement par rapport à la direction de battement des cils. Bien que nous ayons accès à l'étude sur toutes ces échelles, nous allons dans cette partie nous focaliser sur l'échelle de 2 à 3 cellules. Nos observations sur la coordination ciliaire, les difficultés et les défis à relever pour son étude, vont être discutés.

La Figure 82 cartographie une région d'environ $100\ \mu\text{m}$ d'un épithélium bronchique humain (HBE), obtenu par la culture de cellules épithéliales issues d'un patient fumeur en condition ALI, avec le milieu BEGM, 53 jours (J53) après le début de la phase de différenciation. Cette région permet d'illustrer les différentes configurations spatiales des cellules ciliées. La cartographie de la fréquence de battement des cils avec l'orientation moyenne de battement par cellules ciliées (Figure 82A) ainsi que la cartographie instantanée de la phase φ des cils (Figure 82B), montrent l'hétérogénéité de l'activité ciliaire, même à cette échelle. Bien que l'orientation de battement semble organisée, certaines cellules ciliées présentent une fréquence de battement nettement différente de leurs voisines (jusqu'à plus de 3 Hz). Cette différence de fréquence montre l'absence de couplage et de corrélation entre ces cellules, malgré le fait qu'elles soient adjacentes et que l'on pourrait donc s'attendre à la mise en place d'un couplage hydrodynamique. Pour les cellules adjacentes qui battent à la même fréquence, une corrélation spatio-temporelle peut être observée. La cartographie de la phase (Figure 82B) semble montrer une zone de 3 cellules ciliées adjacentes, alignées dans la direction du battement, qui battent en phase (encadré vert). La zone encadrée en bleu, se réfère à une région de 4 cellules adjacentes que l'on peut observer battre de façon corrélée, avec la formation d'une onde métachronale limitée à cette zone, de longueur d'onde $\lambda = 23.4 \pm 1.0\ \mu\text{m}$ et d'orientation perpendiculaire à l'alignement des cellules. Mais la cartographie de la phase rend difficilement compte de cette observation, notamment à cause du bruit.

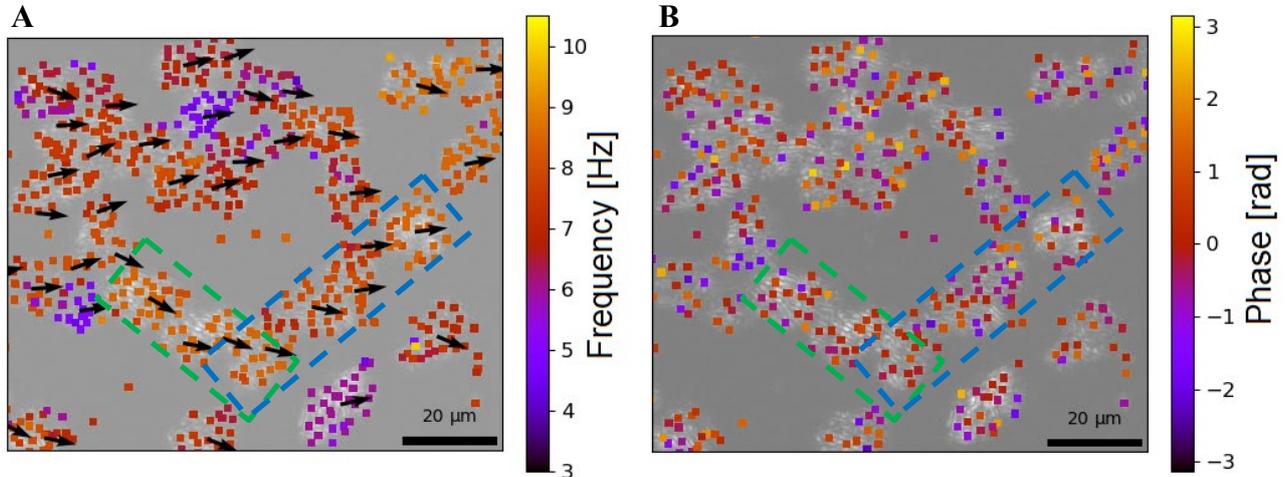


Figure 82 : Cartographie de A) la fréquence moyenne des trajectoires sur la durée du film (code couleur) et de l'orientation moyenne de battement par cellule (flèche noire), et B) de la phase des trajectoires (code couleur) calculée par l'ajustement sinusoïdale sur 3 périodes à un instant t . L'encadré vert se réfère à une zone de coordination en phase du battement des cellules ciliées et l'encadré bleu à une zone de coordination avec un déphasage et la formation d'une onde métachronale. Barre d'échelle : $20\ \mu\text{m}$.

L'hétérogénéité de la fréquence de battement ainsi que de leur type de battement (cf chapitre précédent II.4.2) entre cellules ciliées, même adjacentes, et l'évolution des paramètres du battement au cours du temps, peut expliquer la mauvaise coordination observée dans la majorité des cas, entre

cellules adjacentes. Cette observation est également confirmée lors de l'analyse de la coordination intra-cellule ciliée avec le calcul de la fonction de corrélation F_c (cf chapitre précédent II.4.2), avec un mauvais niveau de couplage au sein de groupes mal identifiés, c'est-à-dire que les trajectoires n'appartiennent pas toutes à la même cellule. Or, l'orientation du battement semble organisée, même à grande échelle (~ 1 mm) et un transport de la couche de mucus est effectif. Il y a donc bien une organisation entre cellules ciliées qu'il doit être possible de quantifier. Afin d'exploiter la méthode d'analyse de la coordination spatio-temporelle mise au point, la fonction de corrélation $F_c(\tau)$ peut être calculée entre cellules ciliées mais en travaillant non pas sur des paires de cils mais sur des paires de sous-ensembles de cils en phase. La valeur de $F_c(\tau)$ du sous-ensemble correspondrait à celle moyenne sur l'ensemble des paires de cils en phase au sein du sous-ensemble. Cette approche permettrait également de quantifier le niveau de coordination entre deux cellules en fonction de leur type de battement (nombre de sous-ensembles en phase au sein de chaque cellule). Les conditions de mise en place d'une onde métachronale à l'échelle de quelques cellules ciliées pourraient être étudiées. Nous pourrions notamment observer l'orientation de cette onde par rapport à celle du battement ou encore par rapport à la direction d'alignement des cellules. Le type de battement au sein des cellules participant à l'émergence de cette onde pourrait également être noté. Ce type est-il le même pour toutes les cellules ? Ceux sont des pistes pour aborder et quantifier cette coordination ciliaire entre cellules ciliées en exploitant ma méthode d'analyse.

II.5. Conclusions et Perspectives

L'outil développé pour caractériser l'activité ciliaire et quantifier la coordination spatio-temporelle du battement nous permet d'accéder aux paramètres du battement (position, orientation, excentricité, amplitude, fréquence, phase) de chaque petit groupe de cils (<10) au sein des cellules ciliées, sur une zone de près de 0,1 mm². La première observation importante est la grande hétérogénéité de l'activité ciliaire. Les différences sont importantes entre les différents puits d'une même culture et encore plus entre cultures. Au sein d'un même puits les variations vont du simple au triple sur la densité de cils actifs et sont de plus de 6 Hz sur la fréquence de battement. Cela complique la comparaison entre différents et l'obtention de différences significatives suite à l'application de divers stimuli.

L'activité ciliaire (densité surfacique de cils actifs et fréquence du battement) ainsi que la vitesse du transport ont été utilisées pour quantifier la réponse du tissu à des stimuli extérieurs (tabac (CSE), inflammation (LPS), diminution de la concentration en Ca²⁺, viscoélasticité du fluide). Nous avons confirmé l'effet délétère de la diminution de la concentration en Ca²⁺ sur l'activité ciliaire et l'augmentation de l'activité ciliaire sous l'augmentation de la charge (poids et volume de la couche de fluide). Un maximum d'activité ciliaire en fonction de la viscosité dynamique η du fluide viscoélastique a été observé, mais il diffère selon que l'on mesure la densité de cils actifs ($\eta \sim 0,2$ Pa.s) ou la fréquence de battement ($\eta \sim 1$ Pa.s). De plus, une valeur maximum bien identifiable n'a pas toujours été obtenue pour la fréquence de battement et elle est inférieure, lorsque présente, à celle mesurée par Pucelle et al. ($\eta \sim 10$ Pa.s). Les effets du tabac en solution (5 % w/v) et d'une inflammation du tissu sur l'activité ciliaire, n'ont pas donné de résultats significatifs sur la population analysée en raison d'un trop faible nombre d'échantillon (N=5 et N=1 respectivement). Néanmoins, la présence de tabac semble augmenter la fréquence de battement et la vitesse de transport associée.

La quantification de l'activité ciliaire comme marqueur de la BPCO n'a pas été établie significativement, due à la faible population dans chacun de nos trois groupes (témoins, fumeurs, BPCO). La comparaison a été effectuée séparément entre les cultures produites avec le milieu BEGM et celles produites avec le milieu PneumaCult car elles sont significativement différentes en termes de densité de cils actifs (p-value = 0,03). La densité de cils actifs après 28 jours de différenciation pour les cultures BEGM dépasse rarement les 10%. En revanche la fréquence de battement entre les deux types de cultures est similaire, autour de 8 à 9 Hz en moyenne.

Nous avons observé l'évolution de la répartition des cellules ciliées sur le tissu au cours de la différenciation de l'épithélium, ainsi que l'évolution de la fréquence moyenne de battement. L'évolution de la densité de cils actifs semble fonctionner par étape, avec une succession d'augmentations brusques suivies d'évolutions plus faibles voire de plateaux. La différence entre la densité de cils présents et celle de cils actifs est importante, près du double pour les jours précoces tant que la culture n'est pas mature (< 20 jours). Cette différence peut expliquer l'augmentation brutale de la densité de cils actifs en moins de 24h et également l'augmentation de la densité de cils

actifs à la suite d'un stimulus extérieur. La répartition des cellules ciliées sur le tissu au cours de leur développement ne semble pas suivre un schéma préférentiel. Nous avons observé de façon égale une prolifération à partir d'amas et une prolifération dispersée en cellules isolées qui finissent par se joindre par « percolation » lorsque la densité dépasse les 40-50%. La fréquence de battement, quant à elle, évolue rapidement sur les jours très précoces (< 16 jours) tant que la densité de cils actifs et le volume de mucus produit est faible, puis se stabilise autour 8 à 9 Hz.

L'étude de la coordination spatio-temporelle du battement, bien que préliminaire, nous a permis de mettre en évidence plusieurs formes de battement : rectiligne, elliptique et circulaire ; et plusieurs types de corrélation temporelle entre les cils au sein d'une même cellule : 1) tous les cils synchrones, 2) plusieurs sous-groupes de cils (2 à 5) en léger déphasage ce qui permet de former une onde métachronale à l'échelle de la cellule, 3) deux blocs en quadrature de phase, et 4) des cellules aux cils dé-coordonnés.

Nous avons également observé que la subdivision des sous-groupes de cils se fait parallèlement à l'axe de battement de la cellule et que ces sous-groupes, ainsi que leurs déphasages, peuvent évoluer au cours du temps, même à l'échelle de 3 ou 4 périodes de battement. Le temps de pause des cils entre la phase 'stroke' et 'recovery-stroke' semble varier et participer à cette réorganisation. A l'échelle de plusieurs cellules, le niveau de corrélation temporelle du battement décroît très vite, même entre cellules adjacentes. Cela s'observe aussi sur l'hétérogénéité de la fréquence de battement entre cellules ciliées, avec des différences de 0 à 4 Hz pour deux cellules adjacentes. Néanmoins, de courtes ondes métachronales entre cellules ciliées adjacentes, battant à la même fréquence, ont été observées, avec des longueurs d'ondes de l'ordre de 20 μm .

Les outils mis en place, en particulier pour la caractérisation de la coordination spatio-temporelle, pourront être exploités pour analyser la coordination inter cellulaire. L'évolution temporelle et la répartition spatiale des différents types de battement observés, une fois leur détermination automatisée, pourront être analysées. Cette analyse pourra se faire notamment en fonction de la densité surfacique de cellules ciliées actives, leur répartition spatiale, mais aussi en fonction du champ d'orientation de battement. Les conditions d'émergence d'une onde métachronale, même à l'échelle de 3 ou 4 cellules seulement, pourront ainsi être éclaircies.

L'étude du couplage entre les propriétés mécaniques du mucus, le niveau de coordination ciliaire à grande échelle, et l'efficacité du transport du mucus, n'a pu être exploré dans cette thèse. Pour cela, la perte de la coordination avec la distance, et la longueur d'onde des ondes métachronales locales, pourront être quantifiées et comparées à la vitesse de transport du mucus, en fonction de ses propriétés mécaniques. Le champ d'orientation de battement devra être comparé à celui du champ de vitesse de transport du fluide.

L'analyse menée de l'activité ciliaire en fonction de divers stimuli extérieurs pourra être étendue à cette étude de la coordination. Les modifications des types de battement et du niveau de coordination entre cellules pourront être observées et quantifiées pour ces divers stimuli extérieurs. Le retour à un état initial du système (valeurs de l'activité ciliaire et du niveau de coordination) ou la mise en place d'un nouvel état à l'équilibre, pourront être observé et le temps mis par le tissu pour ce rééquilibrage après le stimulus pourra être quantifié.

De plus, d'autres types de stimuli peuvent être testés, et leurs effets sur l'activité ciliaire, la coordination et le transport, analysés. Nos collaborateurs biologistes et médecin s'intéressent actuellement à l'effet de la pollution atmosphérique en particules fines (particules nano- à micrométrique) sur les épithélia, et mes outils et analyses pourront participer à la quantification de ces effets sur la fonction mucociliaire. Nos collaborateurs travaillent également sur le développement d'épithélium bronchique humain à partir de cellules pluripotentes induites ('iPS' en anglais), qui consiste à déprogrammer des cellules pour les faire retourner à un état de cellule souche puis de les guider vers un développement en un épithélium bronchique. Mes outils contribuent déjà à valider la fonctionnalité de leurs épithélia issus d'iPS en termes d'activité ciliaire et l'étude de la coordination sur ces tissus est envisagée.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES

Les enjeux biophysiques liés à la fonction mucociliaire de l'épithélium bronchique, et les enjeux médicaux liés aux pathologies respiratoires ont motivé ce projet. Le constat que les mécanismes de cette fonction sont encore mal compris, notamment du point de vue des mécanismes physiques concernant les propriétés mécaniques du mucus et leur couplage avec le battement coordonné des cils pour permettre un transport et une évacuation efficace du mucus, a été le point de départ de nos recherches.

Le mucus est un fluide viscoélastique hétérogène. A l'échelle macroscopique, le mucus se caractérise par un comportement élastique faible mais dominant ($G'(1 \text{ Hz}) \sim 1 \text{ Pa}$), avec une évolution en loi de puissance en fonction de la fréquence de sollicitation dont l'exposant α est proche de 0 (0,1-0,3). A l'échelle microscopique au contraire, la rhéologie du mucus est dominée par la dissipation visqueuse avec des exposants α proches de 1 ($G''(1 \text{ Hz}) \sim 10^{-2} \text{ Pa}$, $\alpha \sim 0,85$). Cependant, à cette même échelle, le mucus présente une élasticité dominante et de l'adhésion localisées près des interfaces. En effet, grâce à la mise en place d'un protocole original pour l'étude de la microrhéologie directement sur le tissu, nous avons montré une augmentation de l'élasticité avec la proximité de l'épithélium, et avec la proximité d'une interface en général. Nos observations de la mécanique du mucus à l'échelle macro- et microscopique, couplées à une imagerie de sa structure par cryo-SEM, nous laissent penser que l'hypothèse d'une structure composée de deux phases et réseaux imbriqués (Gross et al. 2017) est la plus pertinente. Il y aurait un couplage entre un réseau aux pores larges et aux parois élastiques, comme une toile d'araignée, et un réseau au sein d'une solution aqueuse faiblement viscoélastique et à petits pores peu élastiques remplissant les pores du premier réseau. Pour l'utilisation de la rhéologie du mucus comme marqueur des pathologies respiratoires chroniques comme la BPCO, s'il n'y avait pas de différences notables en macrorhéologie entre le groupe témoin et BPCO, nous avons pu montrer qu'il semblerait exister des différences microrhéologiques, notamment sur l'exposant de la loi de puissance de $G''(\omega)$ (p-value=0,015) et sur le rapport G'/G'' (p-value=0,027). Une analyse sur un plus grand nombre d'échantillons permettrait de confirmer ce résultat.

L'activité ciliaire est caractérisée par sa grande hétérogénéité, que ce soit en termes de densité et répartition spatiale des cellules ciliées, ou en termes de fréquences (écart type de $\pm 3 \text{ Hz}$ en moyenne sur $0,1 \text{ mm}^2$) et phases du battement. En revanche, on a pu observer une relative organisation dans le champ d'orientation du battement ciliaire à l'échelle d'un épithélium reconstitué, avec l'orientation du champ de transport qui suit celle du battement ciliaire. Nous avons mesuré l'évolution de cette activité ciliaire et de la vitesse de transport du mucus pour divers stimuli extérieurs (tabac, viscoélasticité du fluide, concentration en Ca^{2+}) et différentes conditions pathologiques (BPCO). La diminution de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire a montré une diminution significative de la fréquence du battement ciliaire, ce qui confirme le rôle du Ca^{2+} dans la régulation intracellulaire du battement. L'impact du tabac ou de la viscoélasticité du fluide n'a pas donné de résultats significatifs

pour les concentrations testées, compte tenu de la grande hétérogénéité de l'activité mesurée à la surface d'un même épithélium. En revanche, l'activité ciliaire (densité de cils actifs et fréquence du battement) augmente significativement sous l'augmentation brutale de la charge sur le tissu (augmentation du poids et du volume de la couche de mucus). L'immersion prolongée du tissu dans un fluide newtonien induit également une réorganisation du transport du mucus à l'échelle du puits de culture avec la formation de vortex, conservée même après le retrait du liquide de l'épithélium.

L'outil original mis au point, d'analyse de la coordination spatio-temporelle entre petits groupes de cils à partir de film de microscopie, nous a permis d'étudier la coordination ciliaire de l'échelle du cil à celle d'une centaine de cellules. A l'échelle du cil, nous avons montré la fluctuation temporelle des paramètres du battement (orientation, fréquence, amplitude, phase), de l'ordre de 10% environ pour la majorité des paramètres jusqu'à près de 50% pour la phase. L'étude de la coordination ciliaire à l'échelle de la cellule ciliée a révélé une bonne corrélation du battement au sein d'une même cellule et l'existence de plusieurs types de battement (cils tous en phase, 2 à 5 sous-ensembles de cils en déphasage). En revanche, l'étude de la coordination inter cellules ciliées n'a pu être pleinement explorée.

Les perspectives les plus prometteuses de mon sujet de thèse sont multiples. Sur l'étude du mucus, l'exploration de la micro-adhésion du mucus, et son évaluation comme marqueur de pathologie respiratoire mériteraient d'être poursuivies. Sur la coordination ciliaire, l'étude entre cellules ciliées a peu été explorée dans cette thèse et doit être poursuivie pour comprendre l'organisation de l'activité ciliaire à l'échelle du tissu. Cette étude permettra également de pouvoir quantifier le couplage entre les propriétés du mucus et le niveau de corrélation spatio-temporelle du battement à grande échelle. Sur l'activité ciliaire, l'étude de la réaction de l'épithélium à divers stimuli extérieurs doit être poursuivie. Nos collaborateurs biologistes et médecin s'intéressent actuellement à l'effet de la pollution atmosphérique en particules fines sur les épithélia, et mes outils et analyses pourront participer à la quantification de ces effets sur la fonction mucociliaire. De plus, l'étude de la réaction aux stimuli extérieurs mériterait d'être étendue à l'analyse de la coordination spatio-temporelle et de son évolution, afin de comprendre la réactivité du battement ciliaire et les mécanismes de réorganisation du couplage. Nos collaborateurs travaillent également sur le développement d'épithélia bronchique humain à partir de cellules pluripotentes induites ('iPS' en anglais). Mes outils contribuent déjà à valider la fonctionnalité des leurs épithélia issus d'iPS en termes d'activité ciliaire et l'étude de la coordination sur ces tissus peut être envisagée.

ANNEXES

A.1. Protocole de traitement du verre au PolyEthylène-Glycol (PEG)

Matériels et produits dont il faut disposer absolument avant de commencer :

Matériels :

- Bain avec ondes ultrasoniques (BRANSON 2510)
- Flux de Plasma (Harrick Plasma, PLASMA CLEANER PDC-002-CE et PLASMAFLO PDC-FMG)
- **Hotte à extraction vers l'extérieur** (attention l'une des étapes nécessite une hotte car les produits utilisés ne doivent pas être respirés !)
- Four

Produits :

- P-Xylène (SIGMA-ALDRICH, 95682 ou 926333) liquide
- (3-glycidoxypropyl)triméthoxysilane (SIGMA-ALDRICH, 440167) appelé Glymo
- Acétone
- PolyEthylène-Glycol appelé PEG (SIGMA-ALDRICH, P4463 ou 89510) en poudre (Av mol wt : 8000)

Le traitement du verre au PEG peut se décomposer en trois grandes étapes : le nettoyage du verre pour le débarrasser de toutes impuretés, un premier traitement pour charger la surface du verre et permettre au PEG d'y adhérer par la suite, et enfin le revêtement au PEG.

Etape 1 : Nettoyage du verre

- 1- Découper les lames à la dimension souhaitée avec une pointe de diamant
- 2- Faire une marque avec une pointe de diamant sur la face à traiter.
- 3- Nettoyer les lames et lamelles dans bain d'eau distillée avec ultrason.
- 4- Sécher avec un pistolet à Azote.

Etape 2 : Traitement de la surface du verre en vue de l'application du PEG

- 5- Passage au Plasma sur les deux faces des lamelles et sur la face à traiter des lames. Application d'un flux d'oxygène pendant 5 min à une pression d'environ 500 MTorr. Cela permet de nettoyer tous les dépôts organiques sur le verre et de créer des silanes (SiH_4) à sa surface qui permettront au Glymo d'y adhérer par la suite.
- 6- Déposer au fond d'une boîte en verre (idéalement du Pyrex) une grille afin de faciliter la récupération des lames et lamelles en suite. **Sous une hotte** verser bande de solution de Glymo / Xylène (P-Xylène) (1/9). La petite bande de solution déposée doit être suffisante pour que lorsqu'on dépose la lamelle, la face inférieure soit totalement recouverte de la solution. Disposer sur la grille dans la solution les lames et lamelles.

Laisser reposer à température ambiante pendant 5h sous la hotte.

- 7- Laver **sous la hotte** l'excès de Glymo avec de l'acétone. Préparer un récipient d'acétone et plonger les lames et lamelles dedans (idéalement à la vertical). Sécher les lames et lamelles (air libre ou tamponner avec du papier Kimtech).
- 8- Laver la grille et la boîte en verre

Etape 3 : Revêtement au PEG du verre

- 9- Redisposer la grille dans la boîte en verre, mettre les lames et lamelles (face traitée au-dessus). Attention à laisser un petit espace entre chaque lame et lamelle pour ne pas les coller entre elles par la suite.
- 10- Saupoudrer ensuite la face enduite de Glymo avec du PEG et mettre au four à 90°C pendant 15h.
- 11- Se munir de pincette de précision pour décoller les lames et lamelles. Attention le PEG doit rester fondu (min 70°C) pour cela. Laver ensuite les lames et lamelles à l'**eau chaude** (90 à 100°C).

Remarque : Il faut prévoir plus de lamelles que de lames car il y a beaucoup de lamelles cassées au cours du protocole.

BIBLIOGRAPHIE

- Ashkin, A., J M Dziedzic, and Steven Chu. 1986. "Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles." *Optics Letters* 11 (5): 288–90.
doi:http://dx.doi.org/10.1364/OL.11.000288.
- Bansil, Rama, Jonathan P. Celli, Joseph M. Hardcastle, and Bradley S. Turner. 2013. "The Influence of Mucus Microstructure and Rheology in Helicobacter Pylori Infection." *Frontiers in Immunology* 4 (OCT): 1–12. doi:10.3389/fimmu.2013.00310.
- Bansil, Rama, and Bradley S. Turner. 2006. "Mucin Structure, Aggregation, Physiological Functions and Biomedical Applications." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 11 (2–3): 164–70. doi:10.1016/j.cocis.2005.11.001.
- Bansil, Rama, and Bradley S Turner. 2018. "The Biology of Mucus : Composition , Synthesis and Organization ☆." *Advanced Drug Delivery Reviews* 124. Elsevier B.V.: 3–15.
doi:10.1016/j.addr.2017.09.023.
- Blake, John. 1973. "Flow in Tubules Due to Ciliary Activity." *Bulletin of Mathematical Biology* 35: 513–23.
- Boers, James E., Anton W. Ambergen, and Frederik B.J.M. Thunnissen. 1999. "Number and Proliferation of Clara Cells in Normal Human Airway Epithelium." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159 (5 I): 1585–91.
doi:10.1164/ajrccm.159.5.9806044.
- Bokkasam, Harish, Matthias Ernst, Marco Guenther, Christian Wagner, Ulrich F. Schaefer, and Claus Michael Lehr. 2016. "Different Macro- and Micro-Rheological Properties of Native Porcine Respiratory and Intestinal Mucus." *International Journal of Pharmaceutics* 510 (1). Elsevier B.V.: 164–67. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.06.035.
- Bosdure, E., and J. C. Dubus. 2006. "Les Effets Du Tabac Chez l'enfant." *Revue Des Maladies Respiratoires* 23 (6): 694–704. doi:10.1016/s0761-8425(06)72083-6.
- Boucher, Richard C. 2019. "Muco-Obstructive Lung Diseases." *New England Journal of Medicine* 380 (20): 1941–53. doi:10.1056/NEJMra1813799.
- Bourdin, A, and P Chanez. 2016. "Le Diagnostic de l'asthme Sévère En 2016" XIX (1): 2–6.
- Breckenridge, Mary Alice B., and W.T. Pommerenke. 1951. "Analysis of Lipid Constituents of the Cervical Secretion." *Fertility and Sterility* 2 (5). Elsevier Masson SAS: 451–58.
doi:10.1016/S0015-0282(16)30665-3.
- Breeze, Roger G., and Eric B. Wheeldon. 1977. "The Cells of the Pulmonary Airways 1, 2." *American Review of Respiratory Disease* 116 (4): 705–77. doi:10.1164/arrd.1977.116.4.705.
- Brumley, Douglas R., Kirsty Y. Wan, Marco Polin, and Raymond E. Goldstein. 2014. "Flagellar Synchronization through Direct Hydrodynamic Interactions." *ELife* 2014 (3): 1–15.
doi:10.7554/eLife.02750.001.
- Bruot, Nicolas, and Pietro Cicuta. 2013. "Emergence of Polar Order and Cooperativity in Hydrodynamically Coupled Model Cilia." *Journal of the Royal Society Interface* 10 (87).
doi:10.1098/rsif.2013.0571.
- Button, Brenda M., and Brian Button. 2013. "Structure and Function of the Mucus Clearance System of the Lung." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (8).
doi:10.1101/cshperspect.a009720.
- Button, Brian, Wayne H. Anderson, and Richard C. Boucher. 2016. "Mucus Hyperconcentration as

a Unifying Aspect of the Chronic Bronchitic Phenotype.” *Annals of the American Thoracic Society* 13 (April): S156–62. doi:10.1513/AnnalsATS.201507-455KV.

- Button, Brian, Li-Heng Cai, Camille Ehre, Mehmet Kesimer, David B Hill, John K Sheehan, Richard C Boucher, and Michael Rubinstein. 2012. “A Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia.” *Science (New York, N.Y.)* 337 (6097): 937–41. doi:10.1126/science.1223012.
- Button, Brian, Henry P. Goodell, Eyad Atieh, Yu-Cheng Chen, Robert Williams, Siddharth Shenoy, Elijah Lackey, et al. 2018. “Roles of Mucus Adhesion and Cohesion in Cough Clearance.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (49): 12501–6. doi:10.1073/pnas.1811787115.
- Button, Brian, Maryse Picher, and Richard C. Boucher. 2007. “Differential Effects of Cyclic and Constant Stress on ATP Release and Mucociliary Transport by Human Airway Epithelia.” *Journal of Physiology* 580 (2): 577–92. doi:10.1113/jphysiol.2006.126086.
- Carpenter, Jerome, Suzanne E. Lynch, Jeremy A. Cribb, Schuyler Kylstra, David B. Hill, and Richard Superfine. 2018. “Buffer Drains and Mucus Is Transported Upward in a Tilted Mucus Clearance Assay.” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 315 (5): L910–18. doi:10.1152/ajplung.00274.2018.
- Català, Frederic, Ferran Marsà, Mario Montes-Usategui, Arnau Farré, and Estela Martín-Badosa. 2017. “Influence of Experimental Parameters on the Laser Heating of an Optical Trap.” *Scientific Reports* 7 (1): 1–9. doi:10.1038/s41598-017-15904-6.
- Celli, Jonathan P., Bradley S. Turner, Nezam H. Afdhal, Randy H. Ewoldt, Gareth H. McKinley, Rama Bansil, Shyamsunder Erramilli, and Shyamsunder Erramilli. 2007. “Rheology of Gastric Mucin Exhibits a PH-Dependent Sol-Gel Transition.” *Biomacromolecules* 8 (5): 1580–86. doi:10.1021/bm0609691.
- Chateau, S, S Poncet, J Favier, and U D Ortona. 2017. “Metachronal Waves Formation in 3D Cilia Arrays Immersed in a Two-Phase Flow Résumé : Abstract :” *Conference Paper “23ème Congrès Français de Mécanique”, 28-1 Septembre 2017, Lille (France)*.
- Chatelin, Robin, Dominique Anne-Archard, Marlène Murriss-Espin, Marc Thiriet, and Philippe Poncet. 2017. “Numerical and Experimental Investigation of Mucociliary Clearance Breakdown in Cystic Fibrosis.” *Journal of Biomechanics* 53. Elsevier Ltd: 56–63. doi:10.1016/j.jbiomech.2016.12.026.
- Chien, Alexander, Sheng Min Shih, Raqual Bower, Douglas Tritschler, Mary E Porter, and Ahmet Yildiz. 2017. “Dynamics of the IFT Machinery at the Ciliary Tip.” *ELife* 6: 1–25. doi:10.7554/elife.28606.
- Chilvers, Mark A, Andrew Rutman, and Christopher O’Callaghan. 2003. “Ciliary Beat Pattern Is Associated with Specific Ultrastructural Defects in Primary Ciliary Dyskinesia.” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112 (3): 518–24. doi:10.1067/mai.2003.1701.
- Chu, Kengyeh K., Carolin Unglert, Tim N. Ford, Dongyao Cui, Robert W. Carruth, Kanwarpal Singh, Linbo Liu, et al. 2016. “In Vivo Imaging of Airway Cilia and Mucus Clearance with Micro-Optical Coherence Tomography.” *Biomedical Optics Express* 7 (7): 2494. doi:10.1364/BOE.7.002494.
- Clary-Meinesz, C., J. Mouroux, J. Cosson, P. Huitorel, and B. Blaive. 1998. “Influence of External PH on Ciliary Beat Frequency in Human Bronchi and Bronchioles.” *European Respiratory Journal* 11 (2): 330–33. doi:10.1183/09031936.98.11020330.
- Cone, Richard A. 2009. “Barrier Properties of Mucus.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2). Elsevier B.V.: 75–85. doi:10.1016/j.addr.2008.09.008.

- Corfield, Anthony P. 2015. "Mucins : A Biologically Relevant Glycan Barrier in Mucosal Protection." *Biochimica et Biophysica Acta* 1850: 236–52. doi:10.1016/j.bbagen.2014.05.003.
- Croft, Jacob T., Davide Zabeo, Radhika Subramanian, and Johanna L. Höög. 2018. "Composition, Structure and Function of the Eukaryotic Flagellum Distal Tip." *Essays In Biochemistry* 62 (6): 815–28. doi:10.1042/ebc20180032.
- Dao, M., C. T. Lim, and S. Suresh. 2003. "Mechanics of the Human Red Blood Cell Deformed by Optical Tweezers." *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 51 (11–12): 2259–80. doi:10.1016/j.jmps.2003.09.019.
- Dawson, Michelle, Denis Wirtz, and Justin Hanes. 2003. "Enhanced Viscoelasticity of Human Cystic Fibrotic Sputum Correlates with Increasing Microheterogeneity in Particle Transport." *Journal of Biological Chemistry* 278 (50): 50393–401. doi:10.1074/jbc.M309026200.
- Demouveau, Bastien, Valérie Gouyer, Frédéric Gottrand, Tetsuharu Narita, and Jean-luc Desseyn. 2018. "Gel-Forming Mucin Interactome Drives Mucus Viscoelasticity." *Advances in Colloid and Interface Science* 252: 69–82. doi:10.1016/j.cis.2017.12.005.
- Dhanisha, Suresh Sulekha, Chandrasekharan Guruvayoorappan, and Prathapan Abeesh. 2018. "Critical Reviews in Oncology / Hematology Mucins : Structural Diversity , Biosynthesis , Its Role in Pathogenesis and as Possible Therapeutic Targets." *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 122 (June 2017). Elsevier: 98–122. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.12.006.
- Dohlman, Claes H., Judith Friend, Vasundhara Kalevar, Dorothy Yagoda, and Endre Balazs. 1976. "The Glycoprotein (Mucus) Content of Tears from Normals and Dry Eye Patients." *Experimental Eye Research* 22 (4): 359–65. doi:10.1016/0014-4835(76)90228-1.
- Drescher, Knut, Raymond E. Goldstein, and Idan Tuval. 2010. "Fidelity of Adaptive Phototaxis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25): 11171–76. doi:10.1073/pnas.1000901107.
- Dunican, Eleanor M., Brett M. Elicker, David S. Gierada, Scott K. Nagle, Mark L. Schiebler, John D. Newell, Wilfred W. Raymond, et al. 2018. "Mucus Plugs in Patients with Asthma Linked to Eosinophilia and Airflow Obstruction." *Journal of Clinical Investigation* 128 (3): 997–1009. doi:10.1172/JCI95693.
- Elgeti, J., R. G. Winkler, and G. Gompper. 2015. "Physics of Microswimmers - Single Particle Motion and Collective Behavior: A Review." *Reports on Progress in Physics* 78 (5). doi:10.1088/0034-4885/78/5/056601.
- Elgeti, Jens, and Gerhard Gompper. 2013. "Emergence of Metachronal Waves in Cilia Arrays." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (12): 4470–75. doi:10.1073/pnas.1218869110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1218869110.
- Eshel, D., Y. Grossman, and Z. Priel. 1985. "Spectral Characterization of Ciliary Beating: Variations of Frequency with Time." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 249 (1): C160–65. doi:10.1152/ajpcell.1985.249.1.c160.
- Eshel, Dan, and Zvi Priel. 1987. "Characterization of Metachronal Wave of Beating Cilia on Frog's Palate Epithelium in Tissue Culture." *Journal of Physiology* 388: 1–8.
- Espinosa-Garcia, Julian, Eric Lauga, and Roberto Zenit. 2013. "Fluid Elasticity Increases the Locomotion of Flexible Swimmers." *Physics of Fluids* 25 (3). doi:10.1063/1.4795166.
- Ewoldt, Randy H., Christian Clasen, a. E. Hosoi, and Gareth H. McKinley. 2007. "Rheological Fingerprinting of Gastropod Pedal Mucus and Synthetic Complex Fluids for Biomimicking Adhesive Locomotion." *Soft Matter* 3: 634. doi:10.1039/b615546d.

- Ewoldt, Randy H., Michael T. Johnston, and Lucas M. Caretta. 2015. “Experimental Challenges of Shear Rheology: How to Avoid Bad Data.” *Complex Fluids in Biological Systems* 7 (1): 3866–71. doi:10.1002/app.
- Faubel, Regina, Christian Westendorf, Eberhard Bodenschatz, and Gregor Eichele. 2016. “Cilia-Based Flow Network in the Brain Ventricles.” *Science* 353 (6295): 176–78. doi:10.1126/science.aae0450.
- Feriani, Luigi, Maya Juenet, Cedar J. Fowler, Nicolas Bruot, Maurizio Chioccioli, Steven M. Holland, Clare E. Bryant, and Pietro Cicuta. 2017. “Assessing the Collective Dynamics of Motile Cilia in Cultures of Human Airway Cells by Multiscale DDM.” *Biophysical Journal* 113 (1). Biophysical Society: 109–19. doi:10.1016/j.bpj.2017.05.028.
- Ferkol, Thomas, and Dean Schraufnagel. 2014. “The Global Burden of Respiratory Disease.” *Annals of the American Thoracic Society* 11 (3): 404–6. doi:10.1513/AnnalsATS.201311-405PS.
- Fisch, Cathy, and Pascale Dupuis-Williams. 2011. “Ultrastructure of Cilia and Flagella - Back to the Future!” *Biology of the Cell* 103 (6): 249–70. doi:10.1042/bc20100139.
- Foster, W. M., E. Langenback, and E. H. Bergofsky. 1980. “Measurement of Tracheal and Bronchial Mucus Velocities in Man: Relation to Lung Clearance.” *American Physiological Society*, 965–71. doi:10.1152/jappl.1980.48.6.965.
- Fredberg, Jeffrey J. 1978. “A Modal Perspective of Lung Response.” *The Journal of the Acoustical Society of America* 63 (3): 962–66. doi:10.1121/1.381776.
- Friedrich, Benjamin M., and Frank Jülicher. 2012. “Flagellar Synchronization Independent of Hydrodynamic Interactions.” *Physical Review Letters* 109 (13): 1–5. doi:10.1103/PhysRevLett.109.138102.
- Fulcher, M Leslie, Sherif Gabriel, Kimberlie A Burns, James R Yankaskas, and Scott H Randell. 2005. “Well-Differentiated Human Airway Epithelial Cell Cultures.” *Methods in Molecular Medicine* 107: 183–206. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492373>.
- Galabert C, Jacquot J, Zahm JM, and Puchelle E. 1987. “Relationships between the Lipid Content and the Rheological Properties of Airway Secretions in Cystic.” *Clinica Chimica Acta* 164 (2): 139–49.
- Gamez, Anne Sophie, Delphine Gras, Aurélie Petit, Lucie Knabe, Nicolas Molinari, Isabelle Vachier, Pascal Chanez, and Arnaud Bourdin. 2015. “Supplementing Defect in Club Cell Secretory Protein Attenuates Airway Inflammation in COPD.” *Chest* 147 (6): 1467–76. doi:10.1378/chest.14-1174.
- Georas, Steve N. 2018. “All Plugged up - Noninvasive Mucus Score to Assess Airway Dysfunction in Asthma.” *Journal of Clinical Investigation* 128 (3): 906–9. doi:10.1172/JCI99726.
- Geyer, Veikko F., Frank Jülicher, Jonathon Howard, and Benjamin M. Friedrich. 2013. “Cell-Body Rocking Is a Dominant Mechanism for Flagellar Synchronization in a Swimming Alga.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (45): 18058–63. doi:10.1073/pnas.1300895110.
- Gheber, Larisa, and Zvi Priel. 1989. “Synchronization between Beating Cilia.” *Biophysical Journal* 55 (1): 183–91. doi:10.1016/S0006-3495(89)82790-0.
- Gheber, Larisa, and Zvi Priel. 1990. “On Metachronism in Ciliary Systems: A Model Describing the Dependence of the Metachronal Wave Properties on the Intrinsic Ciliary Parameters.” *Cell Motility and the Cytoskeleton* 16 (3): 167–81. doi:10.1002/cm.970160304.
- Girod, S., J. M. Zahm, C. Plotkowski, G. Beck, and E. Puchelle. 1992. “Role of the Physiochemical

- Properties of Mucus in the Protection of the Respiratory Epithelium.” *The European Respiratory Journal : Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 5 (4): 477–87.
- Goldstein, Raymond E., Marco Polin, and Idan Tuval. 2009. “Noise and Synchronization in Pairs of Beating Eukaryotic Flagella.” *Physical Review Letters* 103 (16): 1–4. doi:10.1103/PhysRevLett.103.168103.
- Goldstein, Raymond E., Marco Polin, and Idan Tuval. 2011. “Emergence of Synchronized Beating during the Regrowth of Eukaryotic Flagella.” *Physical Review Letters* 107 (14): 1–5. doi:10.1103/PhysRevLett.107.148103.
- Gras, Delphine, Arnaud Bourdin, Isabelle Vachier, Laure De Senneville, Caroline Bonnans, and Pascal Chanez. 2012. “An Ex Vivo Model of Severe Asthma Using Reconstituted Human Bronchial Epithelium.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (5). Elsevier Ltd: 1259–1266.e1. doi:10.1016/j.jaci.2012.01.073.
- Gross, Andreas, Afra Torge, Ulrich F. Schaefer, Marc Schneider, Claus Michael Lehr, and Christian Wagner. 2017. “A Foam Model Highlights the Differences of the Macro- and Microrheology of Respiratory Horse Mucus.” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 71 (March). Elsevier Ltd: 216–22. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.03.009.
- Gueron, S., K. Levit-Gurevich, N. Liron, and J. J. Blum. 1997. “Cilia Internal Mechanism and Metachronal Coordination as the Result of Hydrodynamical Coupling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (12): 6001–6. doi:10.1073/pnas.94.12.6001.
- Guo, Hanliang, Janna Nawroth, Yang Ding, and Eva Kanso. 2014. “Cilia Beating Patterns Are Not Hydrodynamically Optimal.” *Physics of Fluids* 26 (9): 1–12. doi:10.1063/1.489485.
- Hamilton, E., and P. Cicuta. 2018. “Interpreting the Synchronisation of Driven Colloidal Oscillators via the Mean Pair Interaction.” *New Journal of Physics* 20 (9). IOP Publishing: 93028. doi:10.1088/1367-2630/aae103.
- Hanasoge, Srinivas, Peter J. Hesketh, and Alexander Alexeev. 2018. “Metachronal Motion of Artificial Magnetic Cilia.” *Soft Matter* 14 (19). Royal Society of Chemistry: 3689–93. doi:10.1039/c8sm00549d.
- Hattrup, Christine L., and Sandra J. Gendler. 2008. “Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins.” *Annual Review of Physiology* 70 (1): 431–57. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659.
- Hénon, Sylvie, Guillaume Lenormand, Alain Richert, and François Gallet. 1999. “A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers.” *Biophysical Journal* 76 (2): 1145–51. doi:10.1016/S0006-3495(99)77279-6.
- Hill, David B., Paula A. Vasquez, John Mellnik, Scott A. McKinley, Aaron Vose, Frank Mu, Ashley G. Henderson, et al. 2014. “A Biophysical Basis for Mucus Solids Concentration as a Candidate Biomarker for Airways Disease.” *PLoS ONE* 9 (2): 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0087681.
- Hoegger, Mark J., Maged Awadalla, Eman Namati, Omar A. Itani, Anthony J. Fischer, Alexander J. Tucker, Ryan J. Adam, et al. 2014. “Assessing Mucociliary Transport of Single Particles in Vivo Shows Variable Speed and Preference for the Ventral Trachea in Newborn Pigs.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (6): 2355–60. doi:10.1073/pnas.1323633111.
- Holmén, Jessica M., Niclas G. Karlsson, Lubna H. Abdullah, Scott H. Randell, John K. Sheehan, Gunnar C. Hansson, and C. William Davis. 2004. “Mucins and Their O-Glycans from Human

Bronchial Epithelial Cell Cultures.” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (4): L824–34. doi:10.1152/ajplung.00108.2004.

- Hou, Juan, Tyler Brown, Arisa Yoshikawa, Michael J Riedel, John Stingl, Terry E Thomas, Allen C Eaves, and Sharon A Louis. 2017. “PneumaCult -Ex Plus , a Novel Defined and Feeder-Free Medium , Supports the Improved Expansion of Primary Human Airway Epithelial Cells and Maintenance of Their Mucociliary Differentiation Potential in Later Passages.” In *American Thoracic Society Conference 2017*, Poster.
- Hubbard R. 2006. “The Burden of Lung Disease R.” *Thorax* 61 (7): 556–57. doi:10.1136/thx.2005.056309.
- Humphries, Stuart. 2013. “A Physical Explanation of the Temperature Dependence of Physiological Processes Mediated by Cilia and Flagella.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (36): 14693–98. doi:10.1073/pnas.1300891110.
- Iwata, Shuzo, and Izumi Kabasawa. 1971. “Fractionation and Chemical Properties of Tear Mucoids.” *Experimental Eye Research* 12 (3): 360–67. doi:10.1016/0014-4835(71)90161-8.
- Jeffery, Peter, Stephen Holgate, and Sally Wenzel. 2003. “Methods for the Assessment of Endobronchial Biopsies in Clinical Research.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (supplement_1): S1–17. doi:10.1164/rccm.200202-150ws.
- Jonckheere, Nicolas, Nicolas Skrypek, and Frédéric Frénois. 2013. “Biochimie Membrane-Bound Mucin Modular Domains : From Structure to Function.” *Biochimie* 95 (6). Elsevier Masson SAS: 1077–86. doi:10.1016/j.biochi.2012.11.005.
- Jones, D. P., S. V. Ellam, H. Riddle, and B. W. Watson. 1975. “The Measurement of Air Flow in a Forced Expiration Using a Pressure-Sensitive Transistor.” *Medical & Biological Engineering* 13 (1): 71–77. doi:10.1007/BF02478190.
- Juan, Guillermina R Ramirez-san, Arnold J T M Mathijssen, Mu He, Lily Jan, Wallace Marshall, and Manu Prakash. 2019. “Multi-Scale Spatial Heterogeneity Enhances Particle Clearance in Airway Ciliary Arrays.” *BioRxiv*, 1–19. doi:10.1101/665125.
- Kempeneers, Celine, Claire Seaton, and Mark A. Chilvers. 2017. “Variation of Ciliary Beat Pattern in 3 Different Beating Planes in Healthy Subjects.” *Chest* 151 (5). Elsevier Ltd: 993–1001. doi:10.1016/j.chest.2016.09.015.
- Khelloufi, Mustapha Kamel, Etienne Loiseau, Marc Jaeger, Nicolas Molinari, Pascal Chanez, Delphine Gras, and Annie Viallat. 2018. “Spatiotemporal Organization of Cilia Drives Multiscale Mucus Swirls in Model Human Bronchial Epithelium.” *Scientific Reports* 8 (1). Springer US: 1–10. doi:10.1038/s41598-018-20882-4.
- Kirch, J., A. Schneider, B. Abou, A. Hopf, U. F. Schaefer, M. Schneider, C. Schall, C. Wagner, and C.-M. Lehr. 2012. “Optical Tweezers Reveal Relationship between Microstructure and Nanoparticle Penetration of Pulmonary Mucus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (45): 18355–60. doi:10.1073/pnas.1214066109.
- Klindt, Gary S., Christian Ruloff, Christian Wagner, and Benjamin M. Friedrich. 2016. “Load Response of the Flagellar Beat.” *Physical Review Letters* 117 (25): 1–5. doi:10.1103/PhysRevLett.117.258101.
- Kotar, Jurij, Marco Leoni, Bruno Bassetti, Marco Cosentino Lagomarsino, and Pietro Cicuta. 2010. “Hydrodynamic Synchronization of Colloidal Oscillators.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (17): 7669–73. doi:10.1073/pnas.0912455107.
- Lafforgue, Olivier., N. Bouguerra, Sébastien. Poncet, Isabelle. Seyssiecq, Julien. Favier, and S. Elkoun. 2017. “Thermo-Physical Properties of Synthetic Mucus for the Study of Airway

- Clearance.” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 105 (11): 3025–33. doi:10.1002/jbm.a.36161.
- Lafforgue, Olivier, Sébastien Poncet, Isabelle Seyssiecq, and Julien Favier. 2017. “Rheological Characterization of Macromolecular Colloidal Gels as Simulant of Bronchial Mucus.” *AIP Conference Proceedings* 1914 (December). doi:10.1063/1.5016758.
- Lafforgue, Olivier, Isabelle Seyssiecq, Sébastien Poncet, and Julien Favier. 2018. “Rheological Properties of Synthetic Mucus for Airway Clearance.” *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 106 (2): 386–96. doi:10.1002/jbm.a.36251.
- Lagomarsino, M. Cosentino, P. Jona, and B. Bassetti. 2003. “Metachronal Waves for Deterministic Switching Two-State Oscillators with Hydrodynamic Interaction.” *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics* 68 (2): 9. doi:10.1103/PhysRevE.68.021908.
- Lai, Samuel K., Ying Ying Wang, Denis Wirtz, and Justin Hanes. 2009. “Micro- and Macrorheology of Mucus.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2). Elsevier B.V.: 86–100. doi:10.1016/j.addr.2008.09.012.
- Lauga, Eric, and Thomas R. Powers. 2009. “The Hydrodynamics of Swimming Microorganisms.” *Reports on Progress in Physics* 72 (9). doi:10.1088/0034-4885/72/9/096601.
- Leal, Jasmim, Hugh D C Smyth, and Debadyuti Ghosh. 2017. “Physicochemical Properties of Mucus and Their Impact on Transmucosal Drug Delivery.” *International Journal of Pharmaceutics* 532 (1). Elsevier: 555–72. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.018.
- Lee, Seunghwan, Markus Müller, Kurosch Rezwan, and Nicholas D. Spencer. 2005. “Porcine Gastric Mucin (PGM) at the Water/Poly(Dimethylsiloxane) (PDMS) Interface: Influence of PH and Ionic Strength on Its Conformation, Adsorption, and Aqueous Lubrication Properties.” *Langmuir* 21 (18): 8344–53. doi:10.1021/la050779w.
- Lee, W. L., P. G. Jayathilake, Zhijun Tan, D. V. Le, H. P. Lee, and B. C. Khoo. 2011. “Mucociliary Transport: Effect of Mucus Viscosity, Cilia Beat Frequency and Cilia Density.” *Computers and Fluids* 49 (1): 214–21. doi:10.1016/j.compfluid.2011.05.016.
- Lewis, R.W. 1971. “Lipid Composition of Human Bronchial Mucus.” *Lipids* 6 (11): 859–61. doi:10.1007/BF02531221.
- Lieleg, Oliver, and Katharina Ribbeck. 2011. “Biological Hydrogels as Selective Diffusion Barriers.” *Trends in Cell Biology* 21 (9). Elsevier Ltd: 543–51. doi:10.1016/j.tcb.2011.06.002.
- Lin, Bo-Hong, Ming-Hsuan Tsai, Chong-Kuei Lii, and Tsu-Shing Wang. 2016. “IP3 and Calcium Signaling Involved in The Reorganization of the Actin Cytoskeleton And Cell Rounding Induced by Cigarette Smoke Extract in Human Endothelial Cells.” *Environmental Toxicology* 31 (11): 1293–1306. doi:10.1002/tox.22133.
- Lindemann, Charles B. 2007. “The Geometric Clutch as a Working Hypothesis for Future Research on Cilia and Flagella.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1101: 477–93. doi:10.1196/annals.1389.024.
- Lindemann, Charles B., and Kathleen A. Lesich. 2010. “Flagellar and Ciliary Beating: The Proven and the Possible.” *Journal of Cell Science* 123 (4): 519–28. doi:10.1242/jcs.051326.
- Liu, Bin, Thomas R. Powers, and Kenneth S. Breuer. 2011. “Force-Free Swimming of a Model Helical Flagellum in Viscoelastic Fluids.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (49): 19516–20. doi:10.1073/pnas.1113082108.
- Liu, Linbo, Kengyeh K. Chu, Grace H. Houser, Bradford J. Diephuis, Yao Li, Eric J. Wilsterman, Suresh Shastry, et al. 2013. “Method for Quantitative Study of Airway Functional

- Microanatomy Using Micro-Optical Coherence Tomography.” *PLoS ONE* 8 (1): 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0054473.
- Liu, Linbo, Suresh Shastry, Suzanne Byan-Parker, Grace Houser, Kengyeh K. Chu, Susan E. Birket, Courtney M. Fernandez, et al. 2014. “An Autoregulatory Mechanism Governing Mucociliary Transport Is Sensitive to Mucus Load.” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 51 (4): 485–93. doi:10.1165/rcmb.2013-0499MA.
- Liu, Y., D. K. Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, C. F. Chapman, and B. J. Tromberg. 1995. “Evidence for Localized Cell Heating Induced by Infrared Optical Tweezers.” *Biophysical Journal* 68 (5): 2137–44. doi:10.1016/S0006-3495(95)80396-6.
- Lozano, Rafael, Mohsen Naghavi, Kyle Foreman, Stephen Lim, Kenji Shibuya, Victor Aboyans, Jerry Abraham, et al. 2012. “Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.” *The Lancet* 380 (9859): 2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0.
- Ma, Rui, Gary S. Klindt, Ingmar H. Riedel-Kruse, Frank Jülicher, and Benjamin M. Friedrich. 2014. “Active Phase and Amplitude Fluctuations of Flagellar Beating.” *Physical Review Letters* 113 (4): 1–5. doi:10.1103/PhysRevLett.113.048101.
- Macosko, C. 1996. *Rheology: Principles, Measurements and Applications*. Powder Technology. Vol. 86. doi:10.1016/S0032-5910(96)90008-X.
- Maestro, Armando, Nicolas Bruot, Jurij Kotar, Nariya Uchida, Ramin Golestanian, and Pietro Cicuta. 2018. “Control of Synchronization in Models of Hydrodynamically Coupled Motile Cilia.” *Communications Physics* 1 (1). Springer US: 0–7. doi:10.1038/s42005-018-0031-6.
- Marshall, Wallace F., and Joel L. Rosenbaum. 2001. “Intraflagellar Transport Balances Continuous Turnover of Outer Doublet Microtubules: Implications for Flagellar Length Control.” *Journal of Cell Biology* 155 (3): 405–14. doi:10.1083/jcb.200106141.
- Mathijssen, Arnold J.T.M., Francisca Guzmán-Lastra, Andreas Kaiser, and Hartmut Löwen. 2018. “Nutrient Transport Driven by Microbial Active Carpets.” *Physical Review Letters* 121 (24). American Physical Society: 248101. doi:10.1103/PhysRevLett.121.248101.
- Matsui, Hiroto, Scott H. Randell, Steven W. Peretti, C. William Davis, and Richard C. Boucher. 1998. “Coordinated Clearance of Periciliary Liquid and Mucus from Airway Surfaces.” *Journal of Clinical Investigation* 102 (6): 1125–31. doi:10.1172/JCI2687.
- McDowell, Elizabeth M., Lucy A. Barrett, Fred Glavin, Curtis C. Harris, and Benjamin F. Trump. 1978. “The Respiratory Epithelium. I. Human Bronchus.” *Journal of the National Cancer Institute* 61 (2): 539–49. doi:10.1093/jnci/61.2.539.
- McShane, D., J. C. Davies, M. G. Davies, A. Bush, D. M. Geddes, and E. W F W Alton. 2003. “Airway Surface PH in Subjects with Cystic Fibrosis.” *European Respiratory Journal* 21 (1): 37–42. doi:10.1183/09031936.03.00027603.
- Mercier, Matthieu J., Nicolas B. Garnier, and Thierry Dauxois. 2008. “Reflection and Diffraction of Internal Waves Analyzed with the Hilbert Transform.” *Physics of Fluids* 20 (8): 1–10. doi:10.1063/1.2963136.
- Meyer, Alexander, Andrew Marshall, Brian G. Bush, and Eric M. Furst. 2006. “Laser Tweezer Microrheology of a Colloidal Suspension.” *Journal of Rheology* 50 (1): 77–92. doi:10.1122/1.2139098.
- Mitran, Sorin M. 2007. “Metachronal Wave Formation in a Model of Pulmonary Cilia.” *Computers and Structures* 85 (11–14): 763–74. doi:10.1016/j.compstruc.2007.01.015.
- Nanjundappa, Rashmi, Dong Kong, Kyuhwan Shim, Tim Stearns, Steven L Brody, Jadranka

- Loncarek, and Moe R Mahjoub. 2019. "Regulation of Cilia Abundance in Multiciliated Cells." *ELife* 8: 1–23. doi:10.7554/elife.44039.
- Nawaz, Schanila, Paula Sánchez, Kai Bodensiek, Sai Li, Mikael Simons, and Iwan A.T. Schaap. 2012. "Cell Visco-Elasticity Measured with AFM and Optical Trapping at Sub-Micrometer Deformations." *PLoS ONE* 7 (9). doi:10.1371/journal.pone.0045297.
- Nawroth, Janna C., Hanliang Guo, Eric Koch, Elizabeth A.C. Heath-Heckman, John C. Hermanson, Edward G. Ruby, John O. Dabiri, Eva Kanso, and Margaret McFall-Ngai. 2017. "Motile Cilia Create Fluid-Mechanical Microhabitats for the Active Recruitment of the Host Microbiome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (36): 9510–16. doi:10.1073/pnas.1706926114.
- Neuman, Keir C, and Steven M Block. 2004. "Optical Trapping." *Review of Scientific Instruments* 75 (9). American Institute of Physics: 2787–2809. doi:10.1063/1.1785844.
- Nicastro, Daniela, Cindi Schwartz, Jason Pierson, Richard Gaudette, Mary E Porter, and J Richard McIntosh. 2006. "The Molecular Architecture of Axonemes Revealed by Cryoelectron Tomography." *Science* 313 (August): 944–48. doi:10.1126/science.1128618.
- Okuda, Kenichi, Gang Chen, Durai B. Subramani, Monroe Wolf, Rodney C. Gilmore, Takafumi Kato, Giorgia Radicioni, et al. 2019. "Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 199 (6): 715–27. doi:10.1164/rccm.201804-0734OC.
- Oldenburg, Amy L., Raghav K. Chhetri, David B. Hill, and Brian Button. 2012. "Monitoring Airway Mucus Flow and Ciliary Activity with Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 3 (9): 1978. doi:10.1364/boe.3.001978.
- Ou, Guangshuo, Oliver E. Blacque, Joshua J. Snow, Michel R. Leroux, and Jonathan M. Scholey. 2005. "Functional Coordination of Intraflagellar Transport Motors." *Nature* 436 (7050): 583–87. doi:10.1038/nature03818.
- Papon, J F, L Bassinet, G Cariou-Patron, F Zerah-Lancner, a M Vojtek, S Blanchon, B Crestani, et al. 2012. "Quantitative Analysis of Ciliary Beating in Primary Ciliary Dyskinesia: A Pilot Study." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7: 78. doi:10.1186/1750-1172-7-78.
- Pauwels, RA, SA Buist, PMA Calverley, CR Jenkins, and SS Hurd. 2001. "NHLBI / WHO Workshop Summary Global Strategy for the Diagnosis , Management , and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Critical Care Medicine* 163: 1256–76.
- Payre, B., E. Gontier, A. Jarray, Y. Martinez, J. P. Laugier, A. Delalleau, B. M. Gaillard, et al. 2018. "A New HPF Specimen Carrier Adapter for the Use of High-Pressure Freezing with Cryoscanning Electron Microscope: Two Applications: Stearic Acid Organization in a Hydroxypropyl Methylcellulose Matrix and Mice Myocardium." *Journal of Microscopy* 271 (3): 255–65. doi:10.1111/jmi.12713.
- Peterman, Erwin J.G., Frederick Gittes, and Christoph F. Schmidt. 2003. "Laser-Induced Heating in Optical Traps." *Biophysical Journal* 84 (2 I). Elsevier: 1308–16. doi:10.1016/S0006-3495(03)74946-7.
- Petit, Aurelie, Lucie Knabe, Kamel Khelloufi, Myriam Jory, Delphine Gras, Yann Cabon, Malcolm Begg, et al. 2019. "Bronchial Epithelial Calcium Metabolism Impairment in Smokers and COPD: Decreased ORAI3 Signaling." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1–47. doi:10.1165/rcmb.2018-0228oc.
- Philippe, Adrian Marie, Luca Cipelletti, and Domenico Larobina. 2017. "Mucus as an Arrested Phase Separation Gel." *Macromolecules* 50 (20): 8221–30. doi:10.1021/acs.macromol.7b00842.

- Porter, Mary E., and Winfield S. Sale. 2000. "The 9 + 2 Axoneme Anchors Multiple Inner Arm Dyneins and a Network of Kinases and Phosphatases That Control Motility." *Journal of Cell Biology* 151 (5): 37–42. doi:10.1083/jcb.151.5.F37.
- Potter, J L, L W Matthews, J Lemm, and S Spector. 1963. "Human Pulmonary Secretions in Health and Disease." *Annals New York Academy of Sciences* 106: 692–97.
- Puchelle, E., and J. M. Zahm. 1984. "Influence of Rheological Properties of Human Bronchial Secretions on the Ciliary Beat Frequency." *Biorheology* 21 (1–2): 265–72. doi:10.3233/BIR-1984-211-228.
- Puchelle, E., J.M. Zahm, and D. Quemada. 1987. "Rheological Properties Controlling Mucociliary Frequency and Respiratory Mucus Transport." *Biorheology* 24: 557–63.
- Puchelle, E, J.M Zahm, and C Duvivier. 1983. "Spinability of Bronchial Mucus. Relationship with Viscoelasticity and Mucous Transport Properties." *Biorheology* 20 (2): 239–49. doi:10.1016/0042-6989(62)90033-0.
- Qin, B., A. Gopinath, J. Yang, J. P. Gollub, and P. E. Arratia. 2015. "Flagellar Kinematics and Swimming of Algal Cells in Viscoelastic Fluids." *Scientific Reports* 5: 1–7. doi:10.1038/srep09190.
- Radicioni, Giorgia, Rui Cao, Jerome Carpenter, Amina A Ford, Tiffany Wang, Lily Li, and Mehmet Kesimer. 2016. "Interacting Proteins : The Mucin Interactome." *Mucosal Immunology* 9 (6): 1442–54. doi:10.1038/mi.2016.27.The.
- Rhodin, J.A.G. 1966. "Ultrastructure and Function of the Human Tracheal Mucosa." *The American Review of Respiratory Diseases* 93 (3): 1–15.
- Rock, J. R., M. W. Onaitis, E. L. Rawlins, Y. Lu, C. P. Clark, Y. Xue, S. H. Randell, and B. L. M. Hogan. 2009. "Basal Cells as Stem Cells of the Mouse Trachea and Human Airway Epithelium." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (31): 12771–75. doi:10.1073/pnas.0906850106.
- Rose, Mary Callaghan, and Judith A. Voynow. 2006. "Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease." *Physiological Reviews* 86 (1): 245–78. doi:10.1152/physrev.00010.2005.
- Sabater, Yolanda Marín. 2017. "Microswimmers in Viscoelastic Media." In *Hauptseminar Active Matter SS 2017*, 1–11.
- Salathe, Matthias. 2007. "Regulation of Mammalian Ciliary Beating." *Annual Review of Physiology* 69 (1): 401–22. doi:10.1146/annurev.physiol.69.040705.141253.
- Sarosiek, J., B. L. Slomiany, Z. Jozwiak, Y. H. Liau, and A. Slomiany. 1984. "Rheological Properties of Gastric Mucus Glycoprotein: Contribution of Associated Lipids." *Annals of the New York Academy of Sciences* 435 (1): 575–77. doi:10.1111/j.1749-6632.1984.tb13888.x.
- Sartori, Pablo, Veikko F Geyer, Andre Scholich, Frank Jülicher, and Jonathon Howard. 2016. "Dynamic Curvature Regulation Accounts for the Symmetric and Asymmetric Beats of Chlamydomonas Flagella." *ELife* 5: 1–26. doi:10.7554/elife.13258.
- Satir, Peter. 1968. "Studies on Cilia. 3. Further Studies on the Cilium Tip and a 'Sliding Filament' Model of Ciliary Motility." *The Journal of Cell Biology* 39 (1): 77–94. doi:10.1083/jcb.39.1.77.
- Sbihi, Hind, Rozlyn C.T. Boutin, Chelsea Cutler, Mandy Suen, B. Brett Finlay, and Stuart E. Turvey. 2019. "Thinking Bigger: How Early-Life Environmental Exposures Shape the Gut Microbiome and Influence the Development of Asthma and Allergic Disease." *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, no. February: 1–13.

doi:10.1111/all.13812.

- Schuster, Benjamin S., Jung Soo Suk, Graeme F. Woodworth, and Justin Hanes. 2013. "Nanoparticle Diffusion in Respiratory Mucus from Humans without Lung Disease." *Biomaterials* 34 (13). Elsevier Ltd: 3439–46. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.064.
- Serisier, David J., Mary P. Carroll, Janis K. Shute, and Simon A. Young. 2009. "Macrorheology of Cystic Fibrosis, Chronic Obstructive Pulmonary Disease & Normal Sputum." *Respiratory Research* 10: 63. doi:10.1186/1465-9921-10-63.
- Shah, Alok S, Yehuda Ben-Shahar, Thomas O Moninger, Joel N Kline, and Michael J Welsh. 2009. "Motile Cilia of Human Airway." *Science* 325 (August): 1133–34. doi:10.1126/science.1173869.
- Shei, Ren Jay, Jacelyn E. Peabody, and Steven M. Rowe. 2018. "Functional Anatomic Imaging of the Airway Surface." *Annals of the American Thoracic Society* 15: S177–83. doi:10.1513/AnnalsATS.201806-407AW.
- Shingyoji, C., H. Higuchi, M. Yoshimura, E. Katayama, and T. Yanagida. 1998. "Dynein Arms Are Oscillating Force Generators." *Nature* 393 (6686): 711–14. doi:10.1038/31520.
- Shundo, Atsuomi, Koichiro Hori, David P. Penaloza, and Keiji Tanaka. 2013. "Optical Tweezers with Fluorescence Detection for Temperature-Dependent Microrheological Measurements." *Review of Scientific Instruments* 84 (1). doi:10.1063/1.4789429.
- Siddiqui, A. M., A. A. Farooq, and M. A. Rana. 2015. "A Mathematical Model for the Flow of a Casson Fluid Due to Metachronal Beating of Cilia in a Tube." *Scientific World Journal* 2015: 1–12. doi:10.1155/2015/487819.
- Sleep, John, David Wilson, Robert Simmons, and Walter Gratzer. 1999. "Elasticity of the Red Cell Membrane and Its Relation to Hemolytic Disorders: An Optical Tweezers Study." *Biophysical Journal* 77 (6). Elsevier: 3085–95. doi:10.1016/S0006-3495(99)77139-0.
- Smith, D. J., E. A. Gaffney, and J. R. Blake. 2009. "Mathematical Modelling of Cilia-Driven Transport of Biological Fluids." *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 465 (2108): 2417–39. doi:10.1098/rspa.2009.0018.
- Soriano, Joan B., Amanuel Alemu Abajobir, Kalkidan Hassen Abate, Semaw Ferede Abera, Anurag Agrawal, Muktar Beshir Ahmed, Amani Nidhal Aichour, et al. 2017. "Global, Regional, and National Deaths, Prevalence, Disability-Adjusted Life Years, and Years Lived with Disability for Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015." *The Lancet Respiratory Medicine* 5 (9): 691–706. doi:10.1016/S2213-2600(17)30293-X.
- Spungin, B., and A. Silberberg. 1984. "Stimulation of Mucus Secretion, Ciliary Activity, and Transport in Frog Palate Epithelium." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 16 (3). doi:10.1152/ajpcell.1984.247.5.c299.
- Tang, Xiao Xiao, Lynda S. Ostedgaard, Mark J. Hoegger, Thomas O. Moninger, Philip H. Karp, James D. McMenimen, Biswa Choudhury, Ajit Varki, David A. Stoltz, and Michael J. Welsh. 2016. "Acidic pH Increases Airway Surface Liquid Viscosity in Cystic Fibrosis." *Journal of Clinical Investigation* 126 (3): 879–91. doi:10.1172/JCI83922.
- Tassieri, Manlio, Graham M. Gibson, R. M.L. Evans, Alison M. Yao, Rebecca Warren, Miles J. Padgett, and Jonathan M. Cooper. 2010. "Measuring Storage and Loss Moduli Using Optical Tweezers: Broadband Microrheology." *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 81 (2): 1–5. doi:10.1103/PhysRevE.81.026308.
- Tateishi, Kazuhiro, Tomoki Nishida, Kanako Inoue, and Sachiko Tsukita. 2017. "Three-Dimensional Organization of Layered Apical Cytoskeletal Networks Associated with Mouse

- Airway Tissue Development.” *Scientific Reports* 7 (October 2016). Nature Publishing Group: 1–10. doi:10.1038/srep43783.
- Teff, Zvi, Zvi Priel, and Levi A. Gheber. 2008. “The Forces Applied by Cilia Depend Linearly on Their Frequency Due to Constant Geometry of the Effective Stroke.” *Biophysical Journal* 94 (1). Elsevier: 298–305. doi:10.1529/biophysj.107.111724.
- Teff, Zvi, Zvi Priel, and Levi A. Ghebery. 2007. “Forces Applied by Cilia Measured on Explants from Mucociliary Tissue.” *Biophysical Journal* 92 (5). Elsevier: 1813–23. doi:10.1529/biophysj.106.094698.
- Thomas, Biju, Andrew Rutman, Robert A. Hirst, Pranab Haldar, Andrew J. Wardlaw, John Bankart, Christopher E. Brightling, and Christopher O’Callaghan. 2010. “Ciliary Dysfunction and Ultrastructural Abnormalities Are Features of Severe Asthma.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (4). Elsevier Ltd: 722–729.e2. doi:10.1016/j.jaci.2010.05.046.
- Thomases, Becca. 2015. *Complex Fluids in Biological Systems*. Edited by Saverio E. Spagnolie. *Complex Fluids in Biological Systems*. doi:10.1007/978-1-4939-2065-5.
- Uddin, Borhan, Patrick Partscht, Nan-Peng Chen, Annett Neuner, Manuel Weiß, Robert Hardt, Aliakbar Jafarpour, et al. 2019. “The Human Phosphatase CDC14A Modulates Primary Cilium Length by Regulating Centrosomal Actin Nucleation.” *EMBO Reports* 20 (1): e46544. doi:10.15252/embr.201846544.
- Vasquez, Erick S., Jacquelyn Bowser, Cyprianna Swiderski, Keisha B. Walters, and Santanu Kundu. 2014. “Rheological Characterization of Mammalian Lung Mucus.” *RSC Advances* 4 (66). Royal Society of Chemistry: 34780–83. doi:10.1039/c4ra05055j.
- Vasquez, Paula A., Yuan Jin, Erik Palmer, David Hill, and M. Gregory Forest. 2016. “Modeling and Simulation of Mucus Flow in Human Bronchial Epithelial Cell Cultures – Part I: Idealized Axisymmetric Swirling Flow.” *PLoS Computational Biology* 12 (8): 1–28. doi:10.1371/journal.pcbi.1004872.
- Vilfan, Andrej, and Frank Jülicher. 2006. “Hydrodynamic Flow Patterns and Synchronization of Beating Cilia.” *Physical Review Letters* 96 (5): 1–4. doi:10.1103/PhysRevLett.96.058102.
- Wagner, Caroline E, Bradley S Turner, Michael Rubinstein, Gareth H Mckinley, and Katharina Ribbeck. 2017. “A Rheological Study of the Association and Dynamics of MUC5AC Gels.” *Biomacromolecules* 18: 3654–64. doi:10.1021/acs.biomac.7b00809.
- Wan, Kirsty Y., and Raymond E. Goldstein. 2016. “Coordinated Beating of Algal Flagella Is Mediated by Basal Coupling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (20): E2784–93. doi:10.1073/pnas.1518527113.
- Wang, Juan, and Maureen M. Barr. 2018. “Cell–cell Communication via Ciliary Extracellular Vesicles: Clues from Model Systems.” *Essays in Biochemistry* 62 (2): 205–13. doi:10.1042/EBC20170085.
- Wang, Ying Ying, Samuel K. Lai, Laura M. Ensign, Weixi Zhong, Richard Cone, and Justin Hanes. 2013. “The Microstructure and Bulk Rheology of Human Cervicovaginal Mucus Are Remarkably Resistant to Changes in PH.” *Biomacromolecules* 14 (12): 4429–35. doi:10.1021/bm401356q.
- Weigand, W. J., A. Messmore, J. Tu, A. Morales-Sanz, D. L. Blair, D. D. Deheyn, J. S. Urbach, and R. M. Robertson-Anderson. 2017. “Active Microrheology Determines Scaledependent Material Properties of Chaetopterus Mucus.” *PLoS ONE* 12 (5): 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0176732.
- Werner, Ivar. 1959. “The Chemistry of Cervical Mucus.” *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 38 (1 S): 39–43. doi:10.3109/00016345909157998.

Bibliographie

- Wood, Christopher R., and Joel L. Rosenbaum. 2015. "Ciliary Ectosomes: Transmissions from the Cell's Antenna." *Trends in Cell Biology* 25 (5). Elsevier Ltd: 276–85. doi:10.1016/j.tcb.2014.12.008.
- Yakubov, Gleb E., Aristeidis Papagiannopoulos, Elodie Rat, Richard L. Easton, and Thomas A. Waigh. 2007. "Molecular Structure and Rheological Properties of Short-Side-Chain Heavily Glycosylated Porcine Stomach Mucin." *Biomacromolecules* 8 (11): 3467–77. doi:10.1021/bm700607w.
- Yao, Alison, Manlio Tassieri, Miles Padgett, and Jonathan Cooper. 2009. "Microrheology with Optical Tweezers." *Lab on a Chip* 9 (17): 2568–75. doi:10.1039/b907992k.
- Yuan, Shaopeng, Martin Hollinger, Marrah E. Lachowicz-Scroggins, Sheena C. Kerr, Eleanor M. Dunican, Brian M. Daniel, Sudakshina Ghosh, et al. 2015. "Oxidation Increases Mucin Polymer Cross-Links to Stiffen Airway Mucus Gels." *Science Translational Medicine* 7 (276): 1–10. doi:10.1126/scitranslmed.2010525