

Dans les bronches, cils et mucus collaborent pour protéger nos voies aériennes

Étienne Loiseau (etienne.loiseau@univ-amu.fr) et Annie Viallat (annie.viallat@univ-amu.fr)

Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille (CINaM, UMR 7325 CNRS et Aix-Marseille Université), Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex 09

Les maladies respiratoires chroniques, telles que l'asthme, affectent plusieurs centaines de millions de personnes dans le monde et sont en constante croissance. Elles sont liées à la défaillance d'un mécanisme de protection des voies aériennes appelé « clairance mucociliaire ».

Afin de comprendre les mécanismes biophysiques sous-jacents à la clairance mucociliaire, nous avons reconstitué *in vitro*, à partir de cellules humaines, un épithélium bronchique. Cette approche nous a permis de montrer que le couplage hydrodynamique entre les cils et le mucus gouverne la dynamique collective des cils, elle-même responsable du transport du mucus à longue distance.

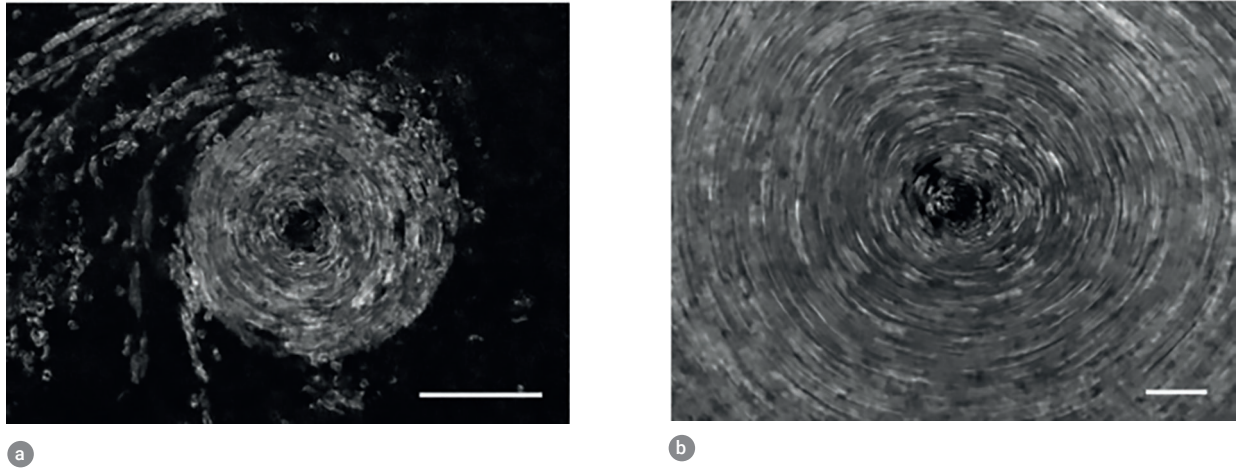
Lorsque l'on respire, on inhale des agents pathogènes tels que des bactéries, virus, allergènes et particules de pollution. Ces pathogènes se retrouvent piégés par une couche de mucus, un fluide viscoélastique et adhésif, présent sur les parois des bronches. Le mucus forme la première barrière physique pour protéger les voies respiratoires. Il est continuellement transporté vers la gorge, *via* le battement de millions de cils microscopiques qui tapissent les bronches, afin d'être évacué (expectoré ou avalé). Ce mécanisme inné qui protège nos

voies aériennes est appelé « clairance mucociliaire ».

La question à laquelle nous nous intéressons est la suivante : **comment des millions de cils vibratiles microscopiques coordonnent-ils leurs directions de battement pour transporter le mucus dans la bonne direction sur des dizaines de centimètres ?** Pour y répondre, nous combinons la physique de la matière active, la biologie cellulaire et la dynamique des fluides numériques.

Ciliogenèse : la densité des cils détermine la portée du transport de mucus

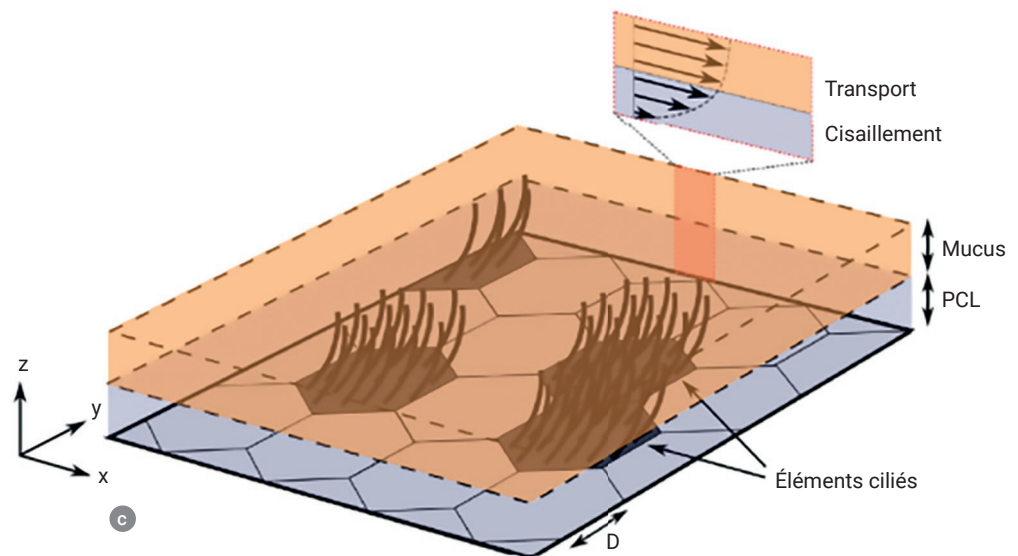
Afin de comprendre comment un écoulement directionnel de mucus émerge et est maintenu au cours du temps, nous avons reconstitué un épithélium bronchique *in vitro* à partir de cellules primaires d'origine humaine. Pour reproduire les conditions physiologiques des voies respiratoires, le tissu est cultivé à l'interface air-liquide. Il est composé principalement de cellules multiciliées dont



1. Émergence de motifs d'écoulements de mucus à la surface de l'épithélium bronchique.

(a, b) Croissance d'un vortex de mucus, sur trois jours, correspondant à une densité ciliaire d'environ 25% (a) et 50% (b). Le vortex de mucus croît par accumulation successive de patches de mucus transportés dans son voisinage. (Barres d'échelle : 100 μm .)

(c) Schéma de l'épithélium bronchique. Les cils présents à la surface des cellules multiciliées battent dans la couche périciliaire (PCL) de faible viscosité. La couche de mucus (de viscosité plus élevée) est transportée à la surface des cils.



chaque surface est couverte de 100 à 300 cils [1], et de cellules productrices de mucus, ce qui en fait un modèle d'étude biologiquement pertinent.

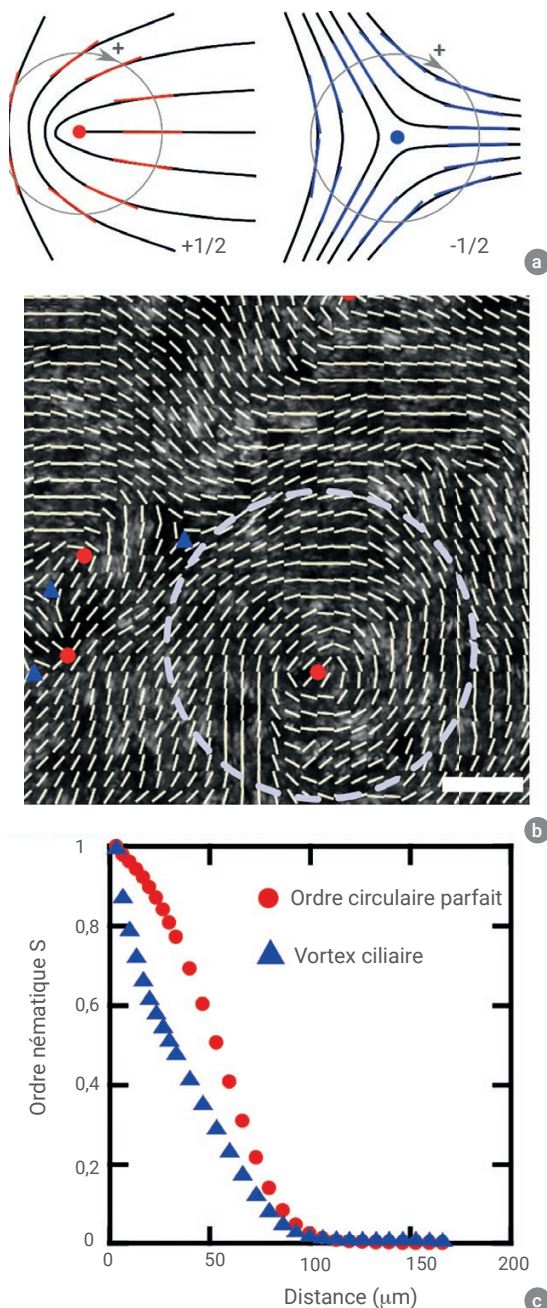
Tout d'abord, nous nous sommes intéressés au processus de « ciliogenèse », c'est-à-dire à l'apparition des cellules multiciliées lors du développement du tissu. L'utilisation de la vidéo-microscopie permet de visualiser et mesurer à la fois la densité ciliaire — pourcentage de la surface du tissu occupé par des cils actifs — et les écoulements de mucus associés. Ainsi, pour des densités ciliaires inférieures à 20 %, la force générée par les battements ciliaires n'est pas suffisante pour mettre en écoulement le mucus,

qui reste donc immobile. Au-dessus de 20 %, le mucus est transporté et l'on observe alors, en de multiples endroits de la culture cellulaire, l'émergence spontanée de motifs d'écoulements circulaires de mucus appelés « vortex ». La taille des vortex croît avec la densité ciliaire, jusqu'à ce qu'un seul de ces vortex occupe toute la surface de la culture pour des densités ciliaires supérieures à 50%, caractéristiques de la densité ciliaire de nos bronches (fig. 1). La taille des vortex est un indicateur de la distance caractéristique sur laquelle le mucus est transporté de façon coordonnée. La densité ciliaire a donc une influence critique sur la portée du transport de mucus.

Le transport de mucus organise les cils

Pour comprendre pourquoi le transport de mucus émerge sous forme de vortex, nous avons utilisé la vidéo-microscopie couplée au traitement d'image, qui permet d'imager et de quantifier la dynamique des battements ciliaires sous un vortex de mucus. La figure 2 montre que les directions des battements ciliaires associées à un vortex de mucus présentent un fort ordre circulaire avec seulement quelques défauts, localisés principalement au centre du vortex. Des zones où les battements ciliaires sont alignés sont également observées.

>>>



2. Ordre orientationnel des battements ciliaires.

(a) Schéma représentant des défauts de charge topologique $+1/2$ et $-1/2$, correspondant à une rotation π du champ directeur dans le même sens ou dans le sens opposé, respectivement, que celui de tout chemin fermé encerclant le défaut (cercles gris).

(b) L'image de fond est obtenue en prenant l'écart-type de la projection temporelle d'un film de battements ciliaires (barre d'échelle : $40 \mu\text{m}$). Ce qui apparaît en tirets blancs correspond aux trajectoires des extrémités des faisceaux de cils. Le champ directeur des directions de battement est tracé en surimpression. Les disques rouges et les triangles bleus sont situés là où une discontinuité dans le champ directeur est présente et sont des défauts topologiques de charge $+1/2$ et $-1/2$, respectivement. Le grand cercle blanc segmenté indique l'emplacement où un vortex de mucus est présent à la surface de l'épithélium. À cet endroit, l'orientation des battements ciliaires présente un fort ordre circulaire.

(c) Sur ce graphique, le paramètre d'ordre nématique expérimental est comparé avec celui d'un ordre circulaire parfait.

>>>

L'ordre orientationnel des battements est quantifié sur une surface carrée de côté L par deux paramètres classiquement utilisés pour les cristaux liquides. Le premier est un paramètre d'ordre nématique local $S(L) = \langle \cos 2\theta \rangle^2 + \langle \sin 2\theta \rangle^2$, où θ est l'angle entre la direction de battement et une direction de référence, et la moyenne $\langle \rangle$ concerne tous les cils dans le domaine de taille L . S varie entre 0 et 1, valeurs qui correspondent respectivement à un état isotrope avec des directions de battement aléatoires, et à un état entièrement ordonné avec des directions de battement alignées. Le deuxième paramètre est le nombre de défauts topologiques définis comme des discontinuités locales dans le champ directeur, qui représente la direction moyenne des battements. Ces défauts sont associés à des charges topologiques $+1/2$ ou $-1/2$, ce qui correspond à une rotation π du champ directeur dans le même sens ou dans le sens opposé, respectivement, que celui de tout chemin fermé encerclant le défaut (fig. 2a).

L'ordre d'orientation des battements ciliaires sous un vortex de mucus est calculé à différentes échelles de longueur L (cellule unique $< L <$ vortex). La moyenne de $S(L)$ est calculée sur un ensemble de tuiles carrées de côté L , qui pavent totalement le vortex de mucus. Elle est comparée à $S(L)$ calculée pour un ordre circulaire parfait, lorsque toutes les directions des battements ciliaires sont tangentes au vortex. La comparaison des deux courbes présentées dans la figure 2c pour un vortex typique de $100 \mu\text{m}$ confirme le fort caractère tangentiel des battements ciliaires.

L'émergence de vortex de mucus, associé à un ordre circulaire des battements ciliaires sous-jacents, pose la question de l'origine du mécanisme physique responsable de l'organisation de ces battements. Les cils sont des structures mécanosensibles [2] (qui ressentent les sollicitations mécaniques) capables de mécano-transduction, c'est-à-dire de convertir un signal mécanique perçu en un signal biochimique à l'intérieur de la cellule pour initier une réponse active, par exemple changer la direction de battement. Notre hypothèse est donc que les interactions hydrodynamiques résultant de l'écoulement

du mucus à la surface des cils jouent un rôle dans l'établissement de la direction de battement de ces derniers, qui génèrent l'écoulement. Pour tester cette hypothèse, nous enlevons le mucus, par lavages successifs, d'une culture dont les directions de battements ciliaires sont globalement coordonnées (vortex présent sur toute la surface). Le mucus est remplacé par une fine couche de fluide, de viscosité similaire à l'eau. On observe alors, à l'échelle de quelques jours, la perte de l'ordre global des battements ciliaires. À la place du vortex global se forment de multiples vortex localisés, et une myriade de défauts topologiques sont créés entre les vortex. *A contrario*, lorsque l'on ajoute du mucus sur cette culture désorganisée, l'organisation circulaire globale des battements ciliaires se recrée en quelques jours, et un vortex, global, de mucus occupe de nouveau la surface de l'épithélium. L'échelle de temps caractéristique, de l'ordre de la journée, pour que les directions de battements se réorganisent, est bien supérieure à la période de rotation d'un vortex, qui est de l'ordre de quelques minutes. Cette expérience révèle que les cils coordonnent leurs directions de battement en présence du mucus. Cette coordination est perdue en l'absence de mucus. L'hydrodynamique organise donc bien la coordination à longue portée des cils. Pour comprendre plus en détail ce couplage entre cils et mucus, nous avons développé un modèle hydrodynamique numérique.

Modélisation hydrodynamique du transport du mucus

Le schéma de principe du modèle théorique est représenté sur la figure 1c (p. 15). Les ingrédients sont les suivants : localement, les battements ciliaires exercent sur le mucus une force modélisée par une force ponctuelle ; l'écoulement global de mucus résultant du forçage conjoint de toutes les cellules ciliées est calculé en résolvant les équations de Navier-Stokes.

Le modèle est basé sur une hypothèse d'orientation : les battements ciliaires et les forces locales associées se réorientent en réponse au flux de mucus calculé. L'effet de la force

hydrodynamique sur le cil n'est pas une réorientation passive de ce dernier, mais le déclenchement d'une réponse active d'origine biochimique nécessaire pour réorienter progressivement, à l'intérieur de la cellule, la base du cil dans la direction locale du flux. Un tel système, initialisé avec une distribution aléatoire des cellules ciliées ainsi que des orientations aléatoires des battements ciliaires, évolue donc vers une solution auto-organisée. Les cils distants interagissent les uns avec les autres par leur contribution individuelle à l'écoulement global du mucus. Pour une description détaillée du modèle, voir la référence [3]. Le modèle comporte deux paramètres importants, déjà mis en évidence par les expériences : la densité ciliaire φ et la portée des interactions hydrodynamiques $\lambda = (\mu_m/\kappa)^{1/2}/D$, où μ_m représente la viscosité du mucus, κ le coefficient de friction du fluide sur la surface de l'épithélium et D la taille d'un élément cilié. En faisant varier numériquement ces deux paramètres,

nous pouvons établir le diagramme de phase de l'écoulement du mucus.

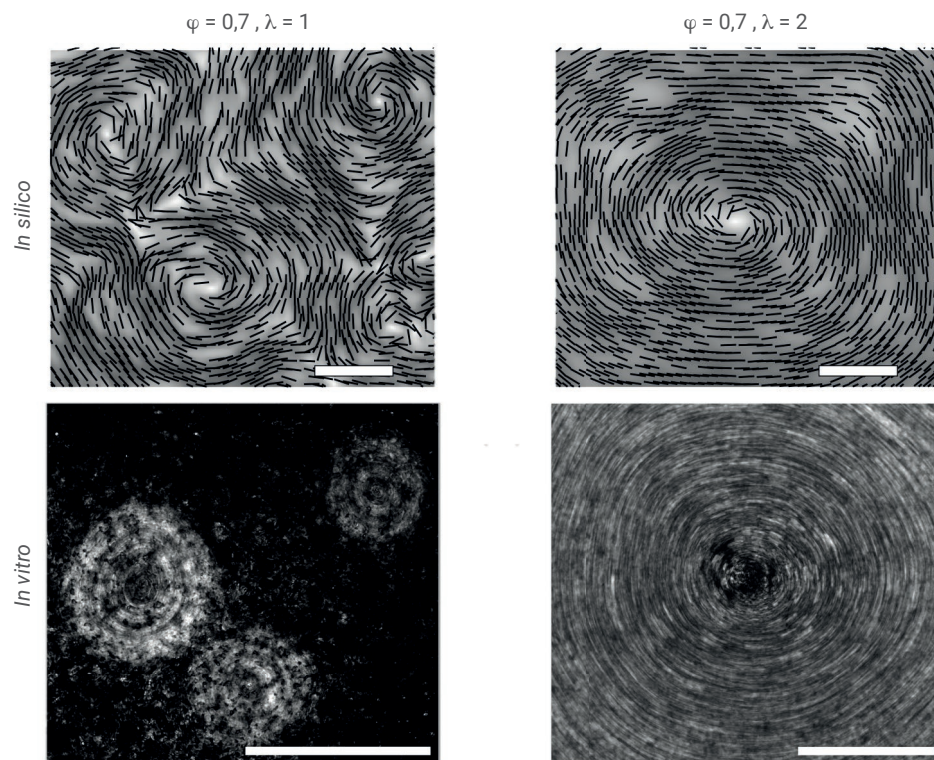
De façon similaire aux expériences *in vitro*, on observe la formation spontanée de petits vortex locaux, dont la taille augmente avec la densité ciliaire. Pour une densité ciliaire fixée, le modèle prédit une transition entre un état où de nombreux petits vortex sont répartis sur toute la surface de l'épithélium numérique, pour des interactions hydrodynamiques de courte portée, et un état où un vortex global occupe toute la surface lorsque l'on augmente leur portée. Les tailles des vortex prédites par le modèle sont quantitativement en accord avec celles observées *in vitro* (fig. 3).

Le paramètre de portée des interactions hydrodynamiques fait intervenir la viscosité du mucus. Les simulations numériques révèlent donc que celle-ci, si elle est plus élevée, favorise la coordination des directions des battements ciliaires et ainsi le transport de mucus sur de longues distances. Cependant, d'un point de vue physiologique, un

mucus trop visqueux pose problème (clairance déficiente, formation de bouchons...). Il doit donc exister une gamme de viscosités pour laquelle le mucus est assez visqueux pour générer une coordination efficace des battements ciliaires, mais pas trop afin que la force produite par les cils soit suffisante pour mettre en écoulement le mucus. Les propriétés rhéologiques (viscosité, élasticité) de ce dernier permettant son transport optimal restent encore à déterminer.

Conclusion

Ce travail apporte un nouvel éclairage sur la clairance mucociliaire. L'image habituelle des battements ciliaires qui fixent la direction du transport de mucus est en réalité plus complexe. Localement, les cils propulsent le mucus, mais l'écoulement qui en résulte génère à son tour une force sur les cils qui contribue, par une réponse active, à l'orientation des battements. C'est ce couplage hydrodynamique complexe qui rend le transport du mucus plus efficace le long des bronches [4]. Ce modèle est une extension de celui de Vicsek [5], bien connu pour décrire les phénomènes collectifs dans les systèmes actifs tels que les bancs de poissons ou les nuées d'oiseaux. ■



3. Modèle hydrodynamique de l'épithélium bronchique, prédiction des motifs d'écoulements.

Comparaison entre la simulation (*in silico*) et l'expérience (*in vitro*). Pour une densité ciliaire $\varphi = 0,7$, typique d'une culture mature, l'augmentation de la portée des interactions hydrodynamiques λ de 1 à 2 entraîne une transition entre de multiples vortex vers un unique vortex global. *In vitro*, nous observons les mêmes motifs d'écoulement de mucus sur des cultures matures en l'absence ou en présence de mucus, respectivement. (Barres d'échelle : 300 μm .)

1• E.K. Vladar *et al.*, "Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell differentiation", *JCI Insight*, **1**(13) (2016) e88027.

2• R.A. Bloodgood, "Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia", *J. Cell Sci.*, **123** (2010) 505-509.

3• S. Gsell, É. Loiseau *et al.*, "Hydrodynamic model of directional ciliary-beat organization in human airways", *Scientific Reports*, **10** (2020) 8405.

4• É. Loiseau, S. Gsell, ... & A. Viallat, "Active mucus-cilia hydrodynamic coupling drives self-organization of human bronchial epithelium", *Nature Physics*, **16** (2020) 1158-1164.

5• T. Vicsek *et al.*, "Novel type of phase transition in a system of self-driven particles", *Physical Review Letters*, **75** (1995) 1226.