

Thèse

Actions de particules d'usure aéroportées sur les propriétés mécaniques et physicochimiques des «films» de surfactant pulmonaire.

Conséquences sur la conception de particules tribo-bio-compatibles

Présentée devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Ecole doctorale : Mécanique, Énergétique, Génie Civil, Acoustique (MEGA), Lyon

Spécialité : Biomécanique

Pour obtenir

Le grade de docteur

Par

Bogdan MUNTEANU

Bio-ingénieur, Master de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Soutenu le 27/04/2015 devant la Commission d'examen

Rapporteur	Thiery Charitat	Professeur	ICS, Strasbourg
Rapporteur	Yves Dubief	Associate Professor	University of Vermont, USA
Membre	Claude Verdier	DR-CNRS	LIPhy, Grenoble
Membre	Bernard Tinland	DR-CNRS	CINAM, Marseille
Membre	Jean-Paul Rieu	Professeur	ILM, UCBL1
Co-directrice de thèse	Ana-Maria Sfarghiu	CR-CNRS	LaMCoS, INSA Lyon
Directeur de thèse	Yves Berthier	DR-CNRS	LaMCoS, INSA Lyon
Invité	Michel Vincent	Chef service pneumologie	Centre Hospitalier Saint-Joseph

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (LaMCoS), CNRS UMR5259 – INSA de Lyon

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Sec : Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 ^e étage 04 72 43 80 46 Insa : R. GOURDON secretariat@edchimie-lyon.fr	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://edeea.ec-lyon.fr Sec : M.C. HAVGOUDOUKIAN Ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60.97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Sec : Safia AIT CHALAL Bat Atrium- UCB Lyon 1 04.72.44.83.62 Insa : S. REVERCHON Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr	M. Fabrice CORDEY Laboratoire de Géologie de Lyon Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Géode – Bureau 225 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.44.83.74 Sylvie.reverchon-pescheux@insa-lyon.fr fabrice.cordey@univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ http://www.ediss-lyon.fr Sec : Safia AIT CHALAL Bat Atrium – UCB Lyon 1 04 72 44 83 62 Insa : Safia.ait-chalal@univ-lyon1.fr	Mme Emmanuelle CANET-SOULAS INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 avenue Jean Capelle INSA de Lyon 696621 Villeurbanne Tél : 04.72.11.90.13 Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr Sec :Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 ^e étage infomaths@univ-lyon1.fr	Mme Sylvie CALABRETTO LIRIS – INSA de Lyon Bat Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 43. 80. 46 Fax 04 72 43 16 87 Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON http://ed34.universite-lyon.fr Sec : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Direction 1 ^{er} et. Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 71.70 Fax 04 72 43 85 28 Ed.materiaux@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://mega.universite-lyon.fr Sec : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Direction 1 ^{er} et. mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72 .43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/ Sec : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS Insa : J.Y. TOUSSAINT viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr	Mme Isabelle VON BUELTZINGLOEWEN Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48 isavonb@dbmail.com

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

À Mirela
À mes Parents, Frères et Sœur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (LaMCoS) de l'INSA de Lyon dirigé par David Duresseix. Je lui remercie de m'y avoir accueilli.

Je souhaite remercier en premier lieu à mon directeur de thèse, M. Yves Berthier, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir encadré. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Un très grand merci à ma co-encadrante de thèse Ana-Maria Sfarghiu, et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche, pour son enthousiasme et sa sympathie et aussi pour m'avoir offert la possibilité de découvrir le monde de la recherche.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à M. Jean-Paul Rieu de l'Institut Lumière Matière (ILM), pour la mise à disposition des moyens expérimentaux de son laboratoire, pour ses conseils qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse et également pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide.

Mes remerciements vont également à :

- M. Bernard Tinland et Frédéric Harb du Centre Interdisciplinaire des Nanosciences de Marseille (CiNaM) avec qui nous avons mené à bien d'importantes collaborations lors des travaux de cette thèse, notamment pour les expériences de recouvrement de fluorescence (FRAPP),
- Mme. Ofelia Maniti de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaire (ICBMS) pour son aide et ses conseils lors des expériences de visualisation par Microscopie d'Angle de Brewster (BAM),
- Agnès Piednoir de l'Institut Lumière Matière (ILM) pour ses conseils avisés et sa bonne humeur sur la partie Microscopie de Force Atomique (AFM).

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à M. Thierry Charitat et M. Yves Dubief pour la lourde charge leur incombant au titre de rapporteur. Pour cela, je tiens à leur exprimer ma gratitude pour l'attention qu'ils ont portée à mon travail.

De plus, je tiens à remercier à tous mes collègues de l'équipe TMI du LaMCoS qui ont contribué à l'ambiance sympathique aussi bien du côté humain que scientifique ; ainsi, une pensée spéciale à : Mihaela, Francesco, Ghassen., Livia, Sayed, Eymard, Serge, Komla, Jérôme R., FangFang, Na W...

Un grand merci à ma famille : mon père, ma mère, mes frères et ma sœur, qui m'ont beaucoup encouragé et m'ont offert leur soutien moral, mais surtout à ma fiancée Mirela, pour la compréhension et plus spécialement pour les encouragements de tous les jours.

Table des matières

Résumé.....	x
Introduction et positionnement.....	xi
Objectif et stratégie	xii
Travaux cités	xiv

Chapitre A. LES PARTICULES AEROPORTEES : SOURCES ET PROPRIETES

A. 1 Introduction	2
A.2 Classification	2
A.3 Sources de particules aéroportées.....	3
A.3.1 Sources d'émission de PM ₁₀ (CITEPA, 2013)	3
A.3.2 Sources d'émission de PM _{2,5} (CITEPA, 2013)	4
A.3.3 Sources d'émission de PM _{0,1} (CITEPA, 2013)	4
A.2. Usure utile et sécurité des transports	5
2.1 Particules aéroportées issues de l'usure des garnitures de freins	6
2.1.1 Taille et nombre de particules	6
2.1.2 Composition.....	7
2.2 Particules aéroportées issues de l'usure des pneumatiques	9
2.2.1 Taille et nombre de particules	9
2.2.2 Composition.....	10
2.3 Particules aéroportées issues de l'usure des rails	11
2.3.1 Taille et nombre des particules	11
2.3.2 Composition.....	12
A. 3. Conclusions préliminaires	13
Travaux cités	14

Chapitre B. LES POUMONS ET LES VOIES RESPIRATOIRES: ORGANES «CIBLE» POUR LES PARTICULES AEROPORTEES

B.1 La respiration et les fonctions pulmonaires	18
B.2 Les poumons – la première ligne de défense.....	18
B.3 Les voies respiratoires - organe cible pour les particules inhalées	19
B.3.1 La zone de conduction - généralités.....	20
B.3.2 La zone de conduction – mécanismes de dépôt des particules	22
B.3.3 La zone intermédiaire - généralités	23
B.3.4 La zone intermédiaire – mécanismes de dépôt des particules	23

B.3.5 La zone respiratoire - généralités	24
B.3.6 La zone respiratoire – mécanismes de dépôt des particules	25
B.3.6.1 La diffusion brownienne	26
B.3.6.2 Les forces électrostatiques.....	26
B.4 Les mécanismes de défense : élimination des particules.....	28
B.4.1 Les mécanismes physiques de défense	28
B.4.2 Les mécanismes immunologiques de défense	29
B.5 Le réponse des voies respiratoires au dépôt des particules inhalées	30
B.4.3 Réponses non-carcinogéniques	30
B.4.4 Réponses carcinogéniques	31
B.5 Concluions préliminaires	32
Travaux cités	34

Chapitre C. SURFACTANT PULMONAIRE: MODELE ACTUEL ET QUESTIONS OUVERTES

C.1 Introduction	39
C.2 Composition et structure du surfactant pulmonaire.....	39
C.2.1 Les phospholipides.....	40
C.2.2 Les lipides neutres.....	45
C.2.3 Les protéines	45
C.2.3.1 Les protéines hydrophiles (SP-A et SP-D).....	46
C.2.3.2 Les protéines hydrophobes (SP-B et SP-C)	47
C.3 Mécanique et biophysique du surfactant pulmonaire	48
C.4 Interactions avec les particules – perturbations du surfactant pulmonaire	51
C.5 Conclusions préliminaires	52
Travaux cités	54

Chapitre D. CHOIX DES PARTICULES ET DU MODELE DE SURFACTANT PULMONAIRE

D.1 Introduction	59
D.2 Les particules modèle	59
D.2.1 Nature de particules	59
D.2.1.1 Particules négatives.....	60
D.2.1.2 Particules positives.....	60
D.2.2 Taille de particules.....	61
D.2.3 Charge de surface des particules.....	62

D.3 Le modèle de surfactant pulmonaire	64
D.3.1 Composition du surfactant modèle utilisé	64
D.3.2 La cuve de Langmuir	66
D.3.3 Visualisation du surfactant pulmonaire	68
D.3.3.1 Structure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide	68
D.3.3.2 Structure du surfactant pulmonaire déposé sur de substrats solides	73
D.3.4 Elasticité du surfactant pulmonaire	81
D.3.4.1 Compression lente	84
D.3.4.2 Sollicitations dynamiques de compression expansion: simulation des cycles respiratoires	86
D.3.4.3 Hystérésis respiratoire de compression-expansion	88
D.3.5 Rôle des protéines	89
D.4 Conclusions préliminaires	93
Travaux cités	95

Chapitre E. ETUDE DE L'INTERACTION AVEC LES PARTICULES : EXPLOITATION DU MODELE

E.1 Introduction.....	99
E.2 Changement des propriétés mécaniques	99
E.2.1 Particules positives vs particules négatives	99
E.2.1.1 Modifications du module d'élasticité du surfactant pulmonaire	100
E.2.1.2 Modifications de l'aire de l'hystérésis de compression-expansion du surfactant pulmonaire.....	102
E.2.2 Particules négatives vs particules «plus négatives»	103
E.2.2.1 Modifications du module d'élasticité du surfactant pulmonaire.....	104
E.2.1.1 Modifications de l'aire de l'hystérésis du surfactant pulmonaire	105
E.2.3 Conclusions préliminaires et hypothèses	106
E.3 Origine des changements des propriétés mécaniques : modification de la microstructure.....	107
E.3.1 Particules positives vs particules négatives.....	109
E.3.2 Particules négatives vs particules « plus négatives »	113
E.3.3 Conclusions préliminaires et hypothèses	116
E.3.4 Confirmation des hypothèses : modélisation dynamique moléculaire.....	118
E.4 Origine des changements de la microstructure : interaction avec les particules	123
E.4.1 Adhésion et adsorption des particules sur le surfactant pulmonaire : Condensation et nucléation des lipides	124
E.5 Conclusions préliminaires.....	134
Travaux cités	136

Conclusions générales.....	137
----------------------------	-----

Annexes

Annexe 1 – Greffage des particules de verre : obtention des particules positives	140
Annexe 2 – La mesure de la taille des particules par Diffusion dynamique de la lumière	141
Principe	141
Traitement mathématique	141
Annexe 3 – Mesure du potentiel zêta des particules par Électrophorèse Laser Doppler (ELS)	143
Annexe 4 – Moyens d'étude des fonctions du surfactant pulmonaire <i>ex vivo</i>	144
Annexe 5 – Mesure de la pression de surface'	145
Annexe 6 - Le marquage avec l'annexine V fluorescente.....	149
Annexe 7 - Action de particules positives et négatives sur le modèle de surfactant pulmonaire + KL ₄	150

Résumé

Actions de particules d'usure aéroportées sur les propriétés mécaniques et physicochimiques des «films» de surfactant pulmonaire. Conséquences sur la conception de particules tribo-bio-compatibles

Paradoxalement, la sécurité routière est assurée entre autre par la production de particules d'usure ! Ainsi, près de 20 000 tonnes de garnitures de frein sont usées par an en France, dont 9 000 tonnes sous forme de particules d'usure aéroportées. Ces particules posent des problèmes de santé car leur composition chimique et leur morphologie font qu'elles interagissent avec la paroi alvéolaire entraînant des pathologies. Au cours de ces pathologies la phase la plus étudiée est la phase inflammatoire qui s'installe une fois que la particule a passé la première barrière de protection qui est le film de surfactant pulmonaire. En revanche, très peu d'études portent sur l'interaction directe des particules aéroportées avec le film de surfactant pulmonaire à cause de difficultés liées aux résolutions des moyens d'investigations cliniques. Alors-que ces études sont d'un intérêt fondamental puisque, de par ses propriétés physicochimiques de surfactant, ce film contrôle la mécanique respiratoire donc la capacité pulmonaire.

Dans ce contexte, cette thèse analyse les mécanismes d'action de particules d'usure aéroportées modèles sur les propriétés physicochimiques et mécaniques des parois alvéolaires et plus particulièrement du film de surfactant pulmonaire. Pour cela, un modèle ex vivo de paroi alvéolaire reproduisant la composition, la microstructure du surfactant ainsi que les sollicitations mécaniques pendant les cycles respiratoires, a été mis au point. L'utilisation de ce modèle et les mesures associées ont permis d'élaborer une démarche d'identification des paramètres significatifs des particules qui déterminent leurs interactions avec le film de surfactant pulmonaire. Cela a permis de montrer que l'électronégativité des particules aéroportées est l'un des paramètres significatifs qui induit des changements couplés à différentes échelles, qui vont de la conformation moléculaire (nano), à la microstructure (micro) et aux propriétés mécaniques (macro) de la paroi alvéolaire, conduisant à la diminution de la capacité respiratoire.

Ce modèle et les premiers résultats permettront à court terme, d'identifier les autres paramètres significatifs qui caractérisent les actions de particules d'usure aéroportées sur les propriétés mécaniques et physicochimiques des parois alvéolaires. Ceci permettra de connaître leurs effets sur la capacité pulmonaire. Par conséquent, à plus long terme, cette connaissance permettra de modifier les matériaux en contact et leurs conditions de frottement pour générer des particules satisfaisant les exigences tribologiques et biologiques, donc tribo-bio-compatibles.

Introduction et positionnement

La pollution atmosphérique, notamment les particules aéroportées « empoisonne » près de neuf urbains sur dix dans le monde. Du fait de leur taille microscopique, elles arrivent à franchir les défenses naturelles de l'organisme et ainsi pénétrer en grand nombre notamment dans le système respiratoire, jusqu'aux alvéoles pulmonaires.

Les effets de la pollution atmosphérique sur la santé sont reconnus depuis l'épisode tragique du smog londonien de décembre 1952 (*Davis, et al., 2002*) (*Bell, et al., 2004*) où plus de 4000 décès ont été associés à l'augmentation excessive, pendant cinq jours, de deux polluants atmosphériques majeurs : le gaz SO₂ (dioxyde de soufre) et des particules fines¹ et ultrafines². A ce titre, au cours des dernières années il y a eu un intérêt croissant sur l'incidence des maladies respiratoires dues à l'exposition à la pollution de l'air, notamment à l'exposition aux particules aéroportées (*Brauer, et al., 2002*). Actuellement, en Europe, ces maladies conduisent à environ 348 000 décès prématurés par an (42 000 en France) (*DGEC, 2010*) (*ANSES, 2014*) (*Boldo, et al., 2006*). Les principaux effets mis en évidence sont des troubles respiratoires ou cardio-respiratoires pouvant survenir à court ou à long terme :

- à court terme, l'exposition aux particules aéroportées provoque des gênes respiratoires, de la toux, des maux de gorge, elle peut déclencher des crises d'asthme ou diminuer la capacité respiratoire. Ces symptômes sont associés à l'interaction des particules avec la couche de surfactant pulmonaire qui couvre les parois internes des alvéoles pulmonaires,
- à long terme elle provoque des maladies respiratoires tels que l'inflammation et le cancer du poumon et des maladies cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde, l'angine de poitrine, les troubles du rythme cardiaque, qui correspondent à l'arrivée des particules en contact avec les tissus pulmonaire, après la « transgression » à travers de la couche de surfactant pulmonaire.

De plus, ces troubles respiratoires sont responsables de plus de 100 000 nouvelles hospitalisations/an, et de quelques centaines de millions de jours d'arrêt de travail ce qui entraîne des pertes économiques pouvant atteindre 780 millions d'euros chaque année³ (*Seethaler, et al.*) (*CAFE, 2005*)

Face à cet enjeu sanitaire et économique des réglementations européennes et mondiales imposent la surveillance des particules aéroportées et fixent des valeurs limites et des objectifs de qualité de l'air ambiant. Ces limites de la concentration moyenne annuelle de particules fines d'un diamètre égal ou inférieur à 10 µm dans l'air (20 µg/m³ fixé par l'OMS) sont largement dépassées⁴, comme c'est le cas pour de nombreuses grandes métropoles du monde : Peshawar, Pakistan (540µg/m³), New Delhi, Inde (305µg/m³), Pékin, Chine (150µg/m³), Paris, France (100µg/m³). Globalement, selon l'OMS la concentration de particules fines d'un diamètre égal ou inférieur à 10 µm s'est accrue de 6 % au cours des trois dernières années et c'est pour cela que les recherches actuelles visent à comprendre les effets nocifs de ces particules sur la santé publique. La plupart de ces recherches se concentrent sur l'étude des réponses biologiques des tissus pulmonaires:

- lésions (*Gualtieri, et al., 2009*),
- inflammations (*Fujii, et al., 2001*) (*Myatt, et al., 2011*),
- mutations génétiques (*Gualtieri, et al., 2012*).

¹ Particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 2,5µm

² Particules dont le diamètre aérodynamique inférieur à 0,1µm

³ 7 870 euros /hospitalisation d'après (*Seethaler, et al.*)

⁴ Valeurs de mars 2014 (*Le Monde* | 07.05.2014)

Ces réponses apparaissent une fois que la particule a passé la première barrière de protection qui est le film de surfactant pulmonaire. En revanche, très peu d'études portent sur l'interaction directe des particules aéroportées avec les barrières biologiques qui protègent le tissu pulmonaire comme par exemple le surfactant pulmonaire qui contrôle la mécanique respiratoire. En plus, la plupart des études actuelles prennent en compte les particules issues de la combustion (dans les moteurs Diesel, dans les chauffages au bois) qui ont enregistré une importante diminution depuis 1990 (CITEPA, 2013). En revanche très peu d'études portent sur les particules issues de l'usure, et encore moins sur celles issues de l'usure utile des plaquettes de frein, des pneumatiques. De plus, ces études sont confrontées à la définition, voire au manque de paramètres, de grandeurs les décrivant, ainsi que leurs interactions avec l'organisme.

Objectif et stratégie

Dans ce contexte cette thèse vise à analyser les mécanismes d'interaction des particules d'usure aéroportées avec le surfactant pulmonaire afin d'identifier la relation entre les paramètres, les grandeurs décrivant les particules et leur effets sur le fonctionnement normal du surfactant pulmonaire, c'est-à-dire leur «toxicité». Cette connaissance sur le niveau de « toxicité » des particules aéroportées permettra d'améliorer nos compétences pour concevoir des nanoparticules moins ou non « toxiques », c'est-à-dire *bio-compatibles*.

Les moyens d'expérimentation *in vivo* étant insuffisants pour nous permettre l'étude d'interaction particules-surfactant pulmonaire, nous avons utilisé une expérimentation *ex vivo*. Pour ce faire, un modèle de surfactant pulmonaire qui permet de simuler les mouvements respiratoires a été utilisé.

Dans cette logique, le travail de cette thèse est présenté en 5 chapitres :

Chapitre A présente les informations générales sur les particules aéroportées, la classification, la terminologie utilisée et les sources de particules, en s'appuyant sur les particules aéroportées *tribo-compatibles*, c'est-à-dire celles issues de l'usure utile des plaquettes de frein, des pneumatiques, des rails.

Chapitre B a pour but de faire une synthèse bibliographique sur les principales caractéristiques du système respiratoire. Il commencera par quelques rappels anatomiques sur les poumons et les voies respiratoires et continuera avec les mécanismes de filtration, dépôt et élimination des particules aéroportées inhalées à tous les étages du système respiratoire.

Chapitre C est une synthèse bibliographique sur les principales caractéristiques du surfactant pulmonaire en termes de composition et structure, aussi que sur son rôle dans la physicochimie et la mécanique respiratoire.

Chapitre D a pour objectif, d'une part de choisir des particules d'usure modèle basées sur les caractéristiques des particules d'usure aéroportées issues de freinage automobile et d'une autre part de réaliser et valider *ex vivo* un modèle de surfactant pulmonaire réaliste qui permet la simulation des cycles respiratoire.

Chapitre E, la dernière partie de cette thèse, est consacrée à l'application du modèle du surfactant pulmonaire mis au point et validé dans le chapitre D dans l'étude de toxicité des particules modèle simulant les particules d'usure aéroportées *tribo-compatibles* (voir chapitre A.2). Il présente aussi une étude numérique simple de dynamique moléculaire qui a pour but de confirmer certains résultats expérimentaux.

Des conclusions préliminaires seront présentées à la fin de chaque chapitre, qui permettront au lecteur de mieux assimiler les informations.

Des **conclusions générales** sur les résultats obtenus ainsi que quelques perspectives aux travaux effectués seront présentées à la fin de ce manuscrit. On a pu ainsi mettre en évidence l'influence de la charge de surface des particules sur les propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire, c'est-à-dire sur leur toxicité. En effet, l'ensemble des résultats expérimentaux montre que l'électronégativité des particules aéroportées est un des paramètres qui détermine leur "toxicité", au sens qu'elles induisent des altérations de la structure du surfactant pulmonaire et par conséquent des diminutions de ses propriétés mécaniques. Ces diminutions des propriétés conduisent au collapse alvéolaire et à la diminution de la capacité respiratoire.

Ces résultats et la démarche associée permettront à court terme, d'identifier d'autres paramètres qui déterminent la "toxicité" des particules d'usure aéroportées. A plus long terme, cette connaissance sur la "toxicité" des particules aéroportées permettra de modifier les matériaux et les conditions de frottement pour concevoir des particules moins ou non toxiques, c'est-à-dire satisfaisant les exigences tribologique et biologiques, donc *tribo-bio-compatibles*.

Pour faciliter la lecture, les protocoles expérimentaux des différentes études appliquées seront présentés en annexes.

Travaux cités

- ANSES** Étude exploratoire du coût socio-économique des polluants de l'air [Rapport]. - 2014.
- Bell M L, Davis D L et Fletcher T** A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution [Revue] // Environ Health Perspect. - 2004. - 1 : Vol. 112. - pp. 6–8.
- Boldo E [et al.]** Apehis: Health Impact Assessment of Long-term Exposure to PM2.5 in 23 European Cities [Revue] // European Journal of Epidemiology. - 2006. - 6 : Vol. 21. - pp. 449-458.
- Brauer M [et al.]** Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children [Revue] // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. - 2002. - 8 : Vol. 166. - pp. 1092-1098.
- CAFE** Damages per tonne emission of PM2.5, NH3, SO2, NOx and VOCs from each EU25 Member State [Rapport]. - [s.l.] : European Commission DG Environment, 2005.
- CITEPA** INVENTAIRE DES EMISSIONS DE POLLUANTS ATMOSPHERIQUES ET DE GAZ A EFFET DE SERRE EN FRANCE [Rapport]. - Paris : [s.n.], 2013.
- Davis D L et Bates D A** Look Back at the London Smog of 1952 and the Half Century Since; A Half Century Later: Recollections of the London Fog [Revue] // Environ Health Perspect. - 2002. - 12 : Vol. 110. - pp. A734–A735.
- DGEC** PLAN PARTICULES: Des mesures nationales et locales pour améliorer la qualité de l'air [Rapport]. - 2010.
- Fujii T [et al.]** Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells [Revue] // Am J Respir Cell Mol Biol. - 2001. - 3 : Vol. 25. - pp. 265-271..
- Gualtieri M [et al.]** Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5 [Revue] // Toxicol Lett. - 2012. - 2 : Vol. 209. - pp. 136-145.
- Gualtieri M [et al.]** Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549) [Revue] // Toxicol Lett. - 2009. - 1 : Vol. 188. - pp. 52-62.
- Myatt T A [et al.]** Markers of inflammation in alveolar cells exposed to fine particulate matter from prescribed fires and urban air [Revue] // J Occup Environ Med. - 2011. - 10 : Vol. 53. - pp. 1110-1114.
- Seethaler R K [et al.]** ECONOMIC COSTS OF AIR POLLUTION-RELATED HEALTHS IMPACT [Revue].
- Watkins J C** The surface properties of pure phospholipid in relation to those of lung extracts [Revue] // Biochimica et Biophysica Acta. - 1968. - Vol. 152. - pp. 239-247.

LES PARTICULES AEROPORTEES :

Sources et propriétés



*Nous n'héritons pas la Terre de nos parents,
nous l'empruntons à nos enfants*

Antoine de Saint-Exupéry

Chapitre A

LES PARTICULES AEROPORTEES :

SOURCES ET PROPRIETES

Ce chapitre présente les informations générales sur les particules aéroportées, la classification, la terminologie utilisée et les sources de particules, en s'appuyant sur les particules aéroportées *tribo-compatibles*, c'est-à-dire celles issues de l'usure utile des plaquettes de frein, des pneumatiques, des rails.

Table des matières

A. 1 Introduction	2
A.2 Classification	2
A.3 Sources de particules aéroportées.....	3
A.3.1 Sources d'émission de PM ₁₀ (CITEPA, 2013).....	3
A.3.2 Sources d'émission de PM _{2.5} (CITEPA, 2013)	4
A.3.3 Sources d'émission de PM _{0.1} (CITEPA, 2013).....	4
A.2. Usure utile et sécurité des transports.....	5
2.1 Particules aéroportées issues de l'usure des garnitures de freins.....	6
2.1.1 Taille et nombre de particules.....	6
2.1.2 Composition	7
2.2 Particules aéroportées issues de l'usure des pneumatiques	9
2.2.1 Taille et nombre de particules.....	9
2.2.2 Composition	10
2.3 Particules aéroportées issues de l'usure des rails.....	11
2.3.1 Taille et nombre des particules	11
2.3.2 Composition	12
A.3. Conclusions préliminaires	13
Travaux cités.....	14

A. 1 Introduction

De nombreuses études récentes montrent que la pollution atmosphérique urbaine liée à la présence de fines particules engendre une élévation de l'incidence des maladies pulmonaire et de la mortalité. Actuellement, en Europe, ces maladies conduisent à environ 348 000 des décès prématurés par an (20 000 en France) (ANSES, 2014) (Boldo, et al., 2006). Les polluants incriminés sont des gaz ou des particules fines (diamètre inférieur à 2.5 μm) et ultrafines (diamètre inférieur à 0.1 μm) qui pénètrent dans l'appareil respiratoire. Ces dernières étant presque invisibles, à partir de la couleur des gaz d'échappement, ont été prises en compte les premières. En revanche, plus discrètes, les particules émises par des autres sources comme par exemple les garnitures de frein, le contact roue-rail et le contact pneu-chaussée, ont été prises en compte plus récemment (Abbasi, et al., 2010) (Salma, et al., 2007) (Johansson, et al., 2003). Les caractéristiques physico-chimiques de ces particules aéroportées vont gouverner leur interaction avec les systèmes biologiques, c'est-à-dire leur toxicité. Evidemment toutes les particules ne sont pas équivalentes en termes d'interaction avec les tissus biologiques. Un facteur important dans le dépôt, la rétention et les effets des particules aéroportées dans le corps humain est la taille (diamètre), comme on le verra dans les chapitres qui suivent. Pour une meilleure compréhension et pour faciliter la lecture, les concepts de base du domaine des particules aéroportées seront présentés par la suite.

A.2 Classification

L'air urbain peut être comparé à « une soupe » dans laquelle les particules aéroportées issues des différentes sources forment un mélange complexe. Les particules aéroportées ont des tailles comprises entre 0.01 μm et environ 10 μm , les particules d'une taille supérieure ayant la tendance à sédimenter assez rapidement, et sont généralement appelés « dustfall ». Les particules aéroportées souvent appelées PM (eng. « particulate matter ») sont classifiées en fonction de leur diamètre aérodynamique, qui est défini comme étant le diamètre d'une sphère à la densité normalisée de 1 g/cm^3 qui a la même vitesse de sédimentation dans l'air immobile ou fluide que les particules elles-mêmes (Hinds, 1999). Comme il est montré dans la figure 1, les particules, d'après leur diamètre aérodynamique sont classifiées en trois catégories :

1. **PM₁₀**, appelées aussi « **grossières** » sont les particules avec un diamètre aérodynamique inférieur à 10 μm . Cette catégorie inclut aussi les catégories suivantes,
2. **PM_{2.5}**, appelées aussi « **fines** » sont les particules avec un diamètre aérodynamique inférieur à 2.5 μm ,
3. **PM_{0.1}**, appelées aussi « **ultrafines** » sont les particules avec un diamètre aérodynamique inférieur à 0.1 μm .

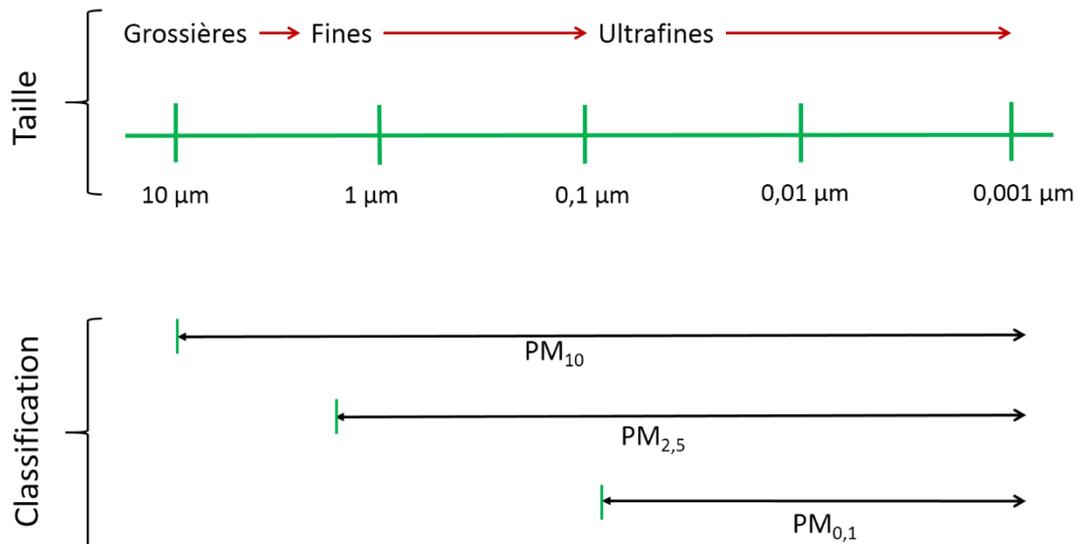


Fig. 1 Classification des particules aéroportées en fonction de leur diamètre aérodynamique d'après (Mühlfeld, et al., 2008)

A.3 Sources de particules aéroportées

Les sources de particules aéroportées sont multiples, incluant à la fois les sources naturelles et anthropogéniques. La contribution de ces sources à la pollution de l'atmosphère varie en fonction des différents facteurs comme par exemple : la région (le nombre et le type de sources locales), la saison, l'heure de la journée, les conditions météo locale et régionales etc.

En 2011, les émissions de particules aéroportées en France métropolitaine s'élèvent à 878 kt (CITEPA, 2013). Tous les secteurs d'activité contribuent aux émissions de particules aéroportées.

A.3.1 Sources d'émission de PM₁₀ (CITEPA, 2013)

En 2011, le niveau d'émission de particules de diamètre inférieur à 10 microns (PM₁₀) en France métropolitaine représente 260 kt. Tous les secteurs contribuent à leurs émissions, soit par ordre de prédominance en 2011 :

- **l'industrie manufacturière** (31%), en particulier le sous-secteur de la construction du fait des chantiers et du BTP⁵ (38,2% du secteur),
- **le résidentiel/tertiaire** (30%), du fait de la combustion du bois et, dans une moindre mesure, du charbon et du fioul,
- **l'agriculture/sylviculture** (20%),
- **le transport** (17%),
- **la transformation d'énergie** (2%),

⁵ Le secteur économique du **bâtiment** et des **travaux publics**, ou BTP, regroupe toutes les activités de conception et de construction des bâtiments publics et privés, industriels ou non, et des infrastructures telles que les routes ou les canalisations

Comme on peut le voir sur la figure 2 les émissions nationales sont en baisse de 51% entre 1990 et 2011 qui correspond à une réduction de 274 kt sur 534 kt. Cette baisse est engendrée, d'une part, par l'amélioration des performances des techniques de dépoussiérage, notamment dans les installations de sidérurgie et, d'autre part, par l'amélioration des technologies pour la combustion de la biomasse. Enfin, l'arrêt de l'exploitation des mines à ciel ouvert en 2002 et des mines souterraines en 2004 contribue aussi à la diminution des émissions (*CITEPA, 2013*).

A.3.2 Sources d'émission de PM_{2.5} (*CITEPA, 2013*)

En 2011, les émissions de particules de diamètre inférieur à 2,5 microns (PM_{2.5}) s'élèvent à 173 kt. Les émissions sont induites par tous les secteurs qui sont par ordre d'importance en 2011 :

- **Le résidentiel/tertiaire** avec 45% des émissions totales de la France métropolitaine,
- **L'industrie manufacturière** 24%,
- **Le transport** 20%,
- **Le secteur de l'agriculture/sylviculture** 9%,
- **La distribution et transformation d'énergie** 2%.

Au sein de ces différents secteurs, les émissions proviennent, d'une part, de la combustion du bois majoritairement domestique ainsi que, dans une moindre mesure, du charbon et du fioul et, d'autre part, de l'exploitation des carrières, des chantiers et BTP et enfin des labours (*CITEPA, 2013*), qui génère des particules d'usure par frottement. Sur la période 1990-2011, les émissions ont été réduites de 58% (- 239 kt) (Fig. 2).

A.3.3 Sources d'émission de PM_{0.1} (*CITEPA, 2013*)

Comme à l'heure actuelle il n'existe pas des surveillances et régulations concernant ce type de particules (qui sont beaucoup plus petites que les particules PM₁₀ et PM_{2.5}) (*Howard, 2009*), on présentera à la place, la statistique et les sources pour les particules PM_{1.0} (particules de diamètre inférieur à 1 µm) qui incluent aussi les PM_{0.1} :

Ainsi, en 2011, les émissions totales de PM_{1.0} en France métropolitaine représentent 123 kt. Les émissions sont engendrées majoritairement par :

- **Le résidentiel/tertiaire** (59% des émissions de la France métropolitaine en 2011) à cause principalement de la combustion du bois et, dans une moindre mesure, du charbon et du fioul.
- **Le transport** se situe en 2011 en seconde position avec 20%.
- **L'industrie manufacturière** 13%,
- **L'agriculture/sylviculture** 6%,
- **La distribution et transformation d'énergie** 2%

Comme on peut observer dans la figure 2, sur la période 1990-2011, les émissions ont baissé de 63%, soit une réduction de 213 kt. Cette tendance à la baisse est observée sur l'ensemble des secteurs. Cette baisse est engendrée, d'une part, par l'amélioration des performances des techniques de dépoussiérage dans l'industrie manufacturière, d'autre part, par les effets de structure, notamment l'amélioration des technologies pour la combustion de la biomasse (secteur du résidentiel/tertiaire) et enfin par l'arrêt de l'exploitation des mines à ciel ouvert en 2002 et des mines souterraines en 2004 (secteur de la transformation d'énergie) (*CITEPA, 2013*).

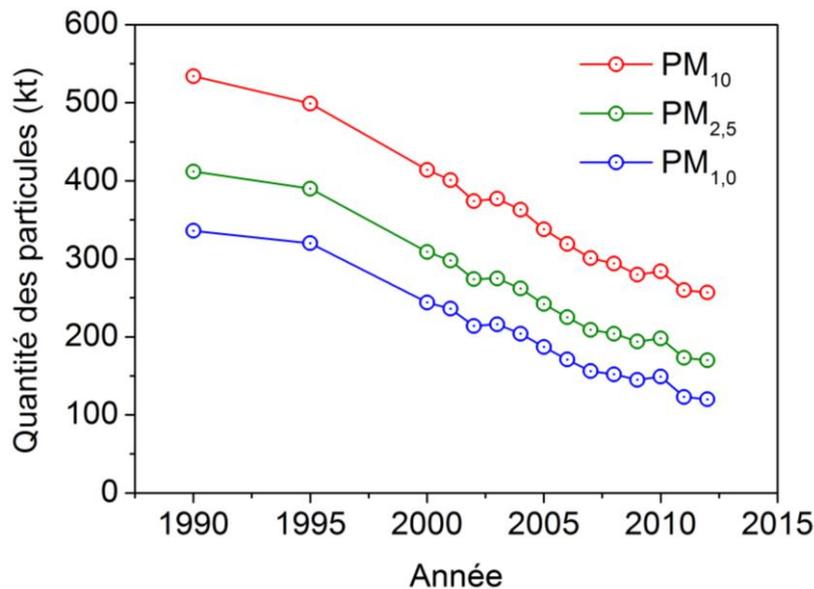


Fig. 2 Evolution des émissions des particules aéroportées dans l'air en France métropolitaine de 1990 à 2012. D'après (CITEPA, 2013)

Il est donc évident que l'une de plus importante source d'émission des particules aéroportées est le transport routier, qui sera présenté par la suite. D'après certains auteurs (Goodwin, et al., 2002), dans les grandes villes le transport routier est responsable de l'émission de 80% des particules aéroportées et cette émission ne fera qu'augmenter faisant ainsi accroître le facteur de dangerosité sur la santé publique. La première raison de cette augmentation fulgurante est la production automobile dans les pays asiatiques et d'Europe de l'Est. Il est déjà connu que la combustion est le mécanisme principal de formation de ces particules mais il y a aussi un grand nombre de processus mécaniques et tribologiques qui contribuent à la sécurité routière et génère des particules aéroportées par usure (COMMISSION, 2004).

A.2. Usure utile et sécurité des transports

Actuellement la définition de l'usure demeure délicate, ambiguë et incomplète. Elle est toutefois définie comme étant un ensemble complexe de phénomènes se produisant dans un contact lors du frottement et qui sont difficiles à interpréter (Wiki, 2006) (Wiki, 2014). Ces phénomènes conduisent notamment à une perte de masse, de cote, de forme, et ils causent souvent des transformations physiques et chimiques des surfaces en contact. Plus généralement, par usure sont générées des particules potentiellement nocives, dont la composition peut être différente de celle des matériaux initiaux. Bien que l'usure soit généralement combattue pour ses effets négatifs, comme l'usure des pièces mécaniques en mouvement ou des prothèses implantées dans le corps humain, néanmoins, dans certaines applications l'usure peut également être utile, à titre d'exemples le rodage d'un mécanisme, l'affûtage d'un outil par abrasion ou l'écriture avec un crayon sur le papier. En revanche, il est moins connu que pour des raisons de sécurité de fonctionnement, l'usure est et sera encore nécessaire pendant de nombreuses années, à titre d'exemple l'usure des :

- **garnitures des freins et du disque** est nécessaire pour assurer un comportement tribologique reproductible des freins dans une large gamme de conditions de freinage,

- **pneumatiques et de la chaussée** est impérative afin de générer des liaisons pendantes sur les pneumatiques et sur la chaussée qui vont interagir entre elles contribuant à l'adhérence,
- **roues et rails** est nécessaire pour privilégier l'usure par rapport à la fissuration. En effet, la fissuration conduisant à des ruptures est plus dangereuse que l'usure. Par conséquent, l'usure doit avoir une vitesse de propagation supérieure à celle de la fissuration, c'est le cas de l'usure des rails. Si leur « usure naturelle » est insuffisante, une usure artificielle est alors pratiquée par meulage.

Il est donc clair que, indépendamment des limites et difficultés s'opposant à l'élaboration de matériaux « à très faible usure », et ce malgré de grandes avancées technologiques dans le domaine de la science des matériaux, pour des raisons de sécurité, un certain niveau d'usure doit être accepté en conduisant à des particules compatibles du point de vue tribologique c'est-à-dire **tribo-compatibles**. Une partie de ces particules est de tailles micro et nanométrique, est aéroportée et possède différentes surfaces spécifiques et différentes chimies de surface. Il en résulte donc que ces particules possèdent différentes réactivités biologiques qui vont se manifester lors de leurs contacts avec l'organisme humain. Par conséquence, par la suite seront présentées les particules aéroportées issues de l'usure des : freins, pneumatiques et rails en s'appuyant sur leur taille et nombre et aussi sur leur composition. Cela permettra d'avoir une vue d'ensemble sur les caractéristiques susceptibles de gouverner leur interaction avec l'organisme humain.

2.1 Particules aéroportées issues de l'usure des garnitures de freins

Le freinage est une fonction vitale permettant de maîtriser le déplacement d'un véhicule afin de garantir la sécurité des personnes et des biens transportés. Parmi les technologies de freinage utilisées dans les transports terrestres (freinage par friction, à courants de Foucault, rhéostatique et par récupération) le freinage par friction, considéré comme le plus fiable, permettant l'arrêt et le maintien à l'arrêt, demeure de loin le plus utilisé, notamment en cas d'arrêt d'urgence.

2.1.1 Taille et nombre de particules

Selon le Comité des Constructeurs Français d'Automobiles (CCFA), la France comptait près de 40 millions de voitures particulières en circulation en 2009 (*LeMatin, 2013*) dont le taux de croissance est estimé supérieur à 1% par an. A nos connaissances, à partir de la quantité des garnitures de frein vendu, la France consomme près de 20 000 tonnes de garniture de frein par an, un chiffre auquel il faut ajouter le freinage des véhicules utilitaires, des bus, des trains, des avions. Prenant en compte les études (*Sanders, et al., 2003*) (*COMMISSION, 2004*) sur des bancs d'essais, qui ont mesuré la quantité des particules émises par le freinage, environ 55-70% (en masse) des particules émises, du fait de leur petite taille, sont aéroportées et constituent par conséquent un facteur de dangerosité pour la santé publique. Par ailleurs, d'autres études (*Garg, et al., 2000*) (*Mohsen, et al., 2004*) indiquent que plus de 88% (en masse) de ces particules sont des PM₁₀, avec deux pics de répartition caractéristiques, comme il est montré sur la figure 3. Le premier pic autour de 350 nm ; commun à toutes les pressions de freinage⁶ et le deuxième pic situé entre 2 et 15 µm qui est dépendant des pressions de freinage (Fig.3A).

⁶ Le freinage a été simulé sur un dispositif en configuration pion-disque, la pression de freinage étant la pression appliqué entre le pion et le disque.

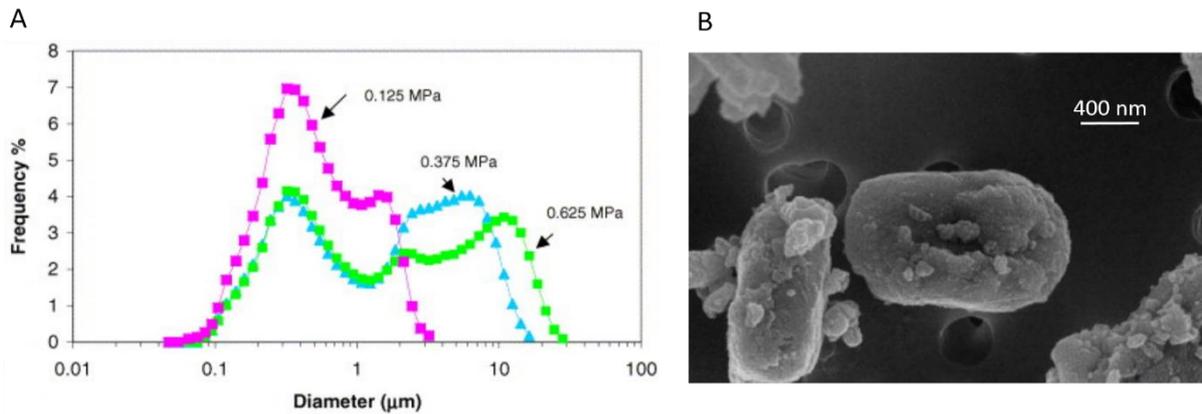


Fig. 3 : A. Distribution de la taille des particules issues de freinage (Mohtsen, et al., 2004). B. Image de microscopie électronique à balayage des particules collectées pendant des simulations de freinage de type pion-disque (Abbasi, et al., 2010)

2.1.2 Composition

Les matériaux de friction utilisés pour les garnitures de freins ont une microstructure extrêmement complexe, qui renfermait jusqu'à trente constituants (fibres minérales et métalliques, poudre de céramique...), limités actuellement à dix, grâce à la réglementation pour la réduction de la pollution lors du processus de fabrication. Cette microstructure, couplée avec la complexité du comportement tribologique du contact, rendent difficile la compréhension du processus d'usure ; processus qui génère des particules d'usure aéroportées (Kasem, et al., 2007) (Cristol-Bulthé, et al., 2008). Alors que la composition chimique des garnitures de frein apporte une indication utile sur la composition de ces particules, les pressions (comprises entre 0.5 et 5 MPa) et les températures très élevées dans le contact peuvent entraîner des modifications chimiques des matériaux. Par conséquent, la composition chimique des particules aéroportées générées est très complexe et peut être différente de celle des matériaux initiaux. Les analyses chimiques des particules aéroportées issues de freinage automobile prouvent la présence, à la fois d'éléments inorganiques et d'éléments organiques. La partie anorganique est présentée dans les études de Hildermann (Hildermann, et al., 1991) selon lesquelles les particules aéroportées issues de l'usure des garnitures de frein contiennent des composés de Pb, Fe, Ni, Cu (voir le tableau 1) qui sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme et générer des maladies (Donaldson, et al., 2006). La partie organique des particules présentée par Rogge (Rogge, et al., 1993) provient des fibres organiques et des liants qui sont utilisés dans la composition des garnitures de frein pour résister aux contraintes mécaniques et à la température. Cette partie organique contient principalement des acides n-alcanoïques (34,3%) et des éthers polyalkylène glycol (56,9%), mais aussi des hydrocarbures aromatiques polycycliques (voir le tableau 2) potentiellement mutagènes et cancérigènes (Albinet, 2006).

Composant anorganique	Quantité (µg/g)	Composant anorganique	Quantité (µg/g)
Al	0,033	Zn	0,027
Si	6,790	Se	0,002
S	1,280	Br	0,004
Cl	0,150	Rb	0,005
K	0,019	Sr	0,074
Ca	0,110	Ba	7,440
Ti	0,360	Pb	10,700
V	0,066	Mg ²⁺	8,300
Cr	0,120	Na ⁺	0,008
Mn	0,170	Cl ⁻	0,150
Fe	11,500	NO ₃ ⁻	0,160
Ni	0,066	SO ₄ ²⁻	3,340
Cu	0,037	NH ₄ ⁺	0,003
Total anorganique			50,914

Tableau 1 Les composants anorganique des particules aéroportées issues par l'usure de garnitures des freins (Hildemann, et al., 1991)

Composant organique	Quantité (µg/g)
n-alcanes	31,090
Acides n-alcanoïques	529,840
Acides n-alcénoïques	10,700
Acide benzoïque	34,500
Benzaldéhydes substitués	19,040
Ethers de polyéthylène glycol	879,100
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	16,200
Cétones et Quinones aromatiques polycycliques	3,010
Stéranes réguliers	2,580
Triterpènes pentacycliques	3,060
Résines naturelles	10,100
Total organique	1539,220

Tableau 2 Les composants organique des particules aéroportées issues par l'usure de garnitures des freins (Rogge, et al., 1993)

2.2 Particules aéroportées issues de l'usure des pneumatiques

Les particules aéroportées issues de l'usure des pneumatiques sont principalement générées lors du contact entre les pneumatiques et la chaussée comme réponse de ces matériaux en contact aux sollicitations tribologiques. Secondairement, les particules sont générées aussi par évaporation de la matière constituant le pneumatique soumis aux températures élevées lors du frottement.

2.2.1 Taille et nombre de particules

En France, 42 000 000 de pneus finissent chaque année en décharge publique, (*Pla14*) sans compter les milliers de tonnes qui sont jetées dans des décharges sauvages. Sachant qu'un pneu neuf d'une voiture particulière pèse environ 8 kg et perd entre 1 et 1.5 kg de poids au cours de sa durée de vie (3 ans, soit 50-60 000 km), il en résulte environ 63 000 tonnes de pneumatiques usés chaque année dont une partie sous forme de particules d'usure aéroportées. Par conséquent l'impact potentiel sur l'environnement et sur la santé publique est aussi très élevé par rapport aux particules d'usure issues de freinage.

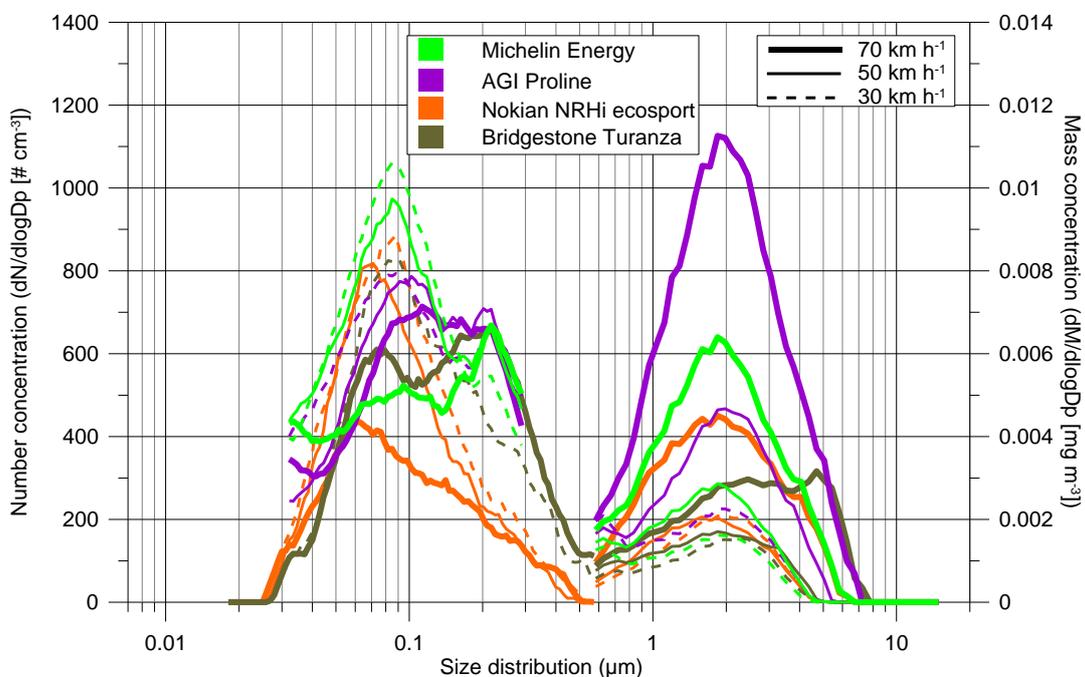


Fig.4 Distribution de la taille des particules issues de l'usure des différents pneus et différentes vitesses de roulement (Gustafsson, 2013)

Comme dans le cas du freinage présenté dans le paragraphe précédent toute la matière usée des pneumatiques ne devient pas aéroportée car une partie s'agglomère en formant des particules de quelques centaines de micromètres (*Camatini, et al., 2001*). Toutefois, il a été montré que toutes les tailles de particules aéroportées (grossières, fines et ultrafines) sont émises par l'usure des pneumatiques. Par exemple, dans leurs études *Cadle et Williams (Cadle, et al., 1979)* ont mis en évidence l'émission des particules aéroportées avec des tailles entre 0.01 et 30 µm. D'autres études ont montré que ces particules ont deux tailles caractéristiques (*Gustafsson, 2013*) (*Cardina, 1974*) mises en évidence par deux pics (Fig. 4) :

- le premier pic représente les particules ayant un diamètre inférieur à 1 µm, générées par la volatilisation (dégradation thermique) de la matière constituant le pneumatique et la

condensation subséquente en particules fines et ultrafines, plus toxiques que les particules grossières,

- le deuxième pic représente les particules ayant un diamètre compris entre 1 et 10 μm . générées par l'usure mécanique (Cadle, et al., 1978).

2.2.2 Composition

Un pneu d'une voiture particulière est composé d'environ 25 % (en masse) de caoutchouc synthétique et de 14 % (en masse) d'agents chimiques, souvent toxiques. Comme mentionné antérieurement la composition des particules d'usure n'est pas fortement identique avec celle des matériaux initiaux, à cause des sollicitations tribologiques qui peuvent générer des températures de contact très élevés et du «malaxage» qui vont conduire à des changements chimique des matériaux. Comme dans le cas du freinage, les analyses chimiques des particules aéroportées issues de l'usure des pneus prouvent la présence, à la fois des éléments anorganiques toxiques comme le Fe et le S (Donaldson, et al., 2006) (Maynard, et al., 2007) (voir le tableau 3) et des éléments organiques mutagènes et cancérigènes comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Albinet, 2006) (voir le tableau 4).

Composant anorganique	Quantité ($\mu\text{g/g}$)	Composant anorganique	Quantité ($\mu\text{g/g}$)
Al	0,047	Zn	0,043
Si	0,180	Se	0,002
S	0,110	Br	0,002
Cl	0,052	Rb	0,000
K	0,038	Sr	0,004
Ca	0,200	Ba	0,037
Ti	0,056	Pb	0,016
V	0,000	Mg ²⁺	0,036
Cr	0,003	Na ⁺	0,068
Mn	0,010	Cl ⁻	0,060
Fe	0,460	NO ₃ ⁻	0,150
Ni	0,005	SO ₄ ²⁻	0,250
Cu	0,049	NH ₄ ⁺	0,019
Total anorganique			1,897

Tableau 3 Les composants anorganique des particules aéroportées issues par l'usure de pneus (Hildemann, et al., 1991)

Composant organique	Quantité (µg/g)
n-alcanes	18840,900
Acides n-alcanoïques	12462,400
Acides n-alcénoïques	1279,200
Acide benzoïque	74,800
Benzaldéhydes substitués	7,800
Ethers de polyéthylène glycol	0,000
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	226,100
Cétones et Quinones aromatiques polycycliques	0,450
Stéranes réguliers	74,200
Triterpènes pentacycliques	684,400
Résines naturelles	9513,300
Total organique	43163,550

Tableau 4 Les composants organique des particules aéroportées issues par l'usure des pneumatiques. Ils proviennent du caoutchouc synthétique et des autres agents chimiques utilisés dans la composition des pneus (Rogge, et al., 1993)

2.3 Particules aéroportées issues de l'usure des rails

Le comportement du contact roue-rail est très complexe et une approche multi et interdisciplinaire (mécanique, tribologie, physico-chimie) est nécessaire pour en comprendre le fonctionnement. Par exemple, il faut savoir que pour assurer la sécurité du transport ferroviaire, un certain niveau d'usure des rails est nécessaire pour privilégier l'usure par rapport à la fissuration. Cette usure conduit à une genèse de particules.

2.3.1 Taille et nombre des particules

La perte de masse sur la totalité des rails en France est d'environ 26 000 tonnes/an dont une partie est sous forme de particules aéroportées, donc l'impact potentiel sur l'environnement et la santé publique est très élevée. En effet, selon une récente étude (Abbasi, et al., 2013) sur le frottement d'un contact roue-rail⁷, les particules d'usure générées ont des tailles comprises entre 0.01 µm et 0.54 µm, (fig. 5) très dangereuses pour la santé du fait de leur petite taille.

⁷ Le contact roue-rail a été simulé par un contact pion-disque

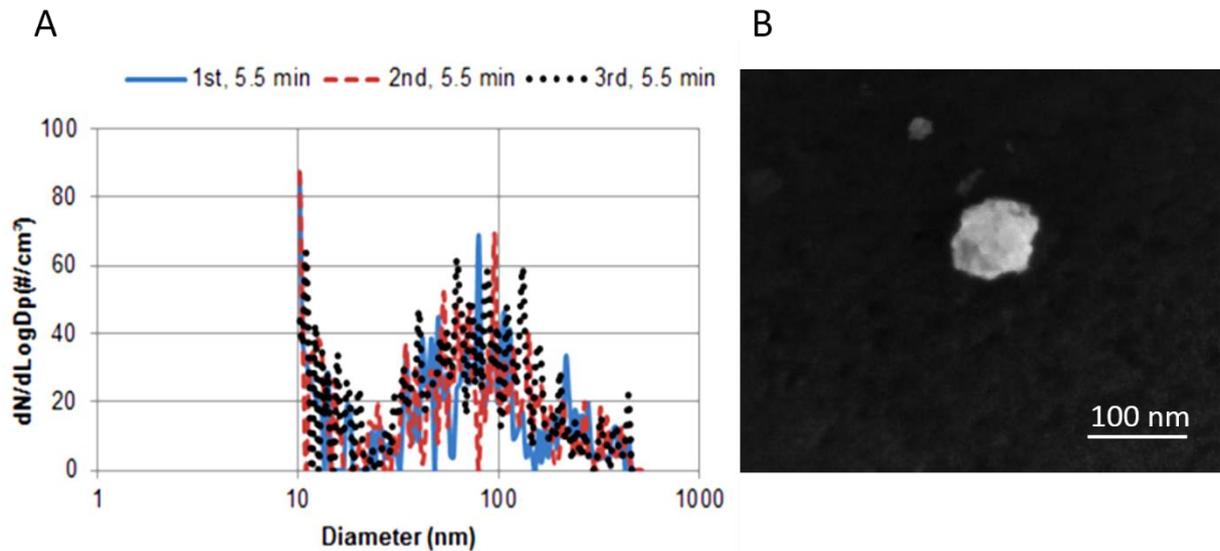


Fig. 5 : A. Distribution de la taille des particules issues du contact roue-rail (Abbasi, et al., 2013). B. Image de microscopie électronique à balayage d'une particule collectée pendant des simulations du contact roue-rail (Sundh, et al., 2011)

2.3.2 Composition

Certaines études portant sur la composition chimique de ces particules indiquent une composition de 60% Fe et 20% matière organique (en masse) (Abbasi, et al., 2013). D'autres études présentent une composition anorganique plus détaillé de ces particules (Gehrig, et al., 2007), les résultats étant présentés dans le tableau 5.

Composant anorganique	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		
	Echantillonnage à 10 m des rails	Echantillonnage à 36 m des rails	Echantillonnage à 120 m des rails
Pb	0.014	0.014	0.013
Zn	0.054	0.061	0.053
Cu	0.060	0.042	0.029
Ni	0.003	0.003	0.002
Fe	1.680	1.120	0.880
Mn	0.019	0.013	0.011
Cr	0.006	0.004	0.003
Ca	0.310	0.310	0.330
K	0.300	0.270	0.290
S	0.940	0.840	0.890
P	0.027	0.024	0.023
Al	0.078	0.076	0.075
Mg	0.079	0.073	0.073
Na	0.180	0.170	0.180

Tableau 5. Composition chimique des particules PM_{10} issues de transport ferroviaire pour différentes sites d'échantillonnage (Gehrig, et al., 2007)

On observe la présence de métaux toxiques, comme par exemple Fe, Cu, Cr, Ni... capables d'intervenir dans les processus biologiques et générer des radicaux libres (*Donaldson, et al., 2006*) entraînant des dommages de l'organisme.

A. 3. Conclusions préliminaires

Les transports routier et ferroviaire sont l'une des plus importantes sources d'émission de particules aéroportées en France (entre 17% et 20% de la totalité des particules aéroportées émises) (*CITEPA, 2013*). Bien que la combustion dans les moteurs thermiques soit le mécanisme principal de formation de ces particules il y a aussi un grand nombre de processus mécaniques et tribologiques qui assure la sécurité routière et ferroviaire et génère des particules aéroportées par usure. Dans ce rapport ont été présentés les informations générales sur les particules aéroportées issues des processus tribologiques (particules tribo-compatibles), comme l'usure des garnitures de frein, l'usure des pneumatiques et l'usure des rails. Toutes ces sources génèrent des particules aéroportées de tailles comprises entre 0.01 μm et 10 μm ayant différentes propriétés, ce qui signifie différentes interactions avec l'organisme humain car elles contiennent dans la plupart des cas des métaux toxiques et/ou des substances potentiellement mutagènes et cancérigènes.

Un autre aspect qui doit être mentionné est le fait que les particules d'usure aéroportées contribuent à la pollution atmosphérique directement par elles-mêmes, mais aussi indirectement en jouant le rôle de « support » pour d'autres polluants comme les gaz toxiques ou d'autres particules plus fines. Par exemple, selon les études de Tomiyasu (*Tomiyasu, et al., 2004*), les particules de combustion qui sont beaucoup plus fines que les particules d'usure sont « adsorbées » sur la surface de celles-ci et peuvent pénétrer ainsi dans le système respiratoire.

Tenant compte de ces aspects il est donc nécessaire de :

- Comprendre les interactions entre les particules d'usure «**tribo-compatibles**» et l'organisme humain, notamment avec les barrières biologiques comme par exemple le surfactant pulmonaire afin d'évaluer l'impact sur la santé publique et identifier ensuite la typologie de particules «**bio-compatibles**». Il sera alors possible par la suite d'envisager des modifications / améliorations des matériaux et leurs conditions opérationnelles de frottement afin de favoriser le détachement de particules «**tribo-bio-compatibles**» !
- Réduire l'émission des particules d'usure en limitant l'usure et/ou en installant des systèmes de collecte des particules sans affecter la sécurité tribologique.

Travaux cités

- Abbasi S [et al.]** A study of airborne wear particles generated from organic railway brake pads and brake discs [Conférence] // 14th Nordic Conference on Tribology. - Storforsen, Sweden : [s.n.], 2010. - pp. 8-11.
- Abbasi S [et al.]** Particle Emissions From Rail Traffic: A Literature Review [Revue] // Critical Reviews in Environmental Science and Technology. - 2013. - Vol. 43. - pp. 2511-2544.
- Abbasi S [et al.]** Pin-on-disc study of the effects of railway friction modifiers on airborne wear particles from wheel-rail contacts [Revue] // Tribology International. - 2013. - Vol. 60. - pp. 136-139.
- Albinet A** These: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et leurs dérivés nitrés et oxygénés dans l'air ambiant: caractérisation physicochimiques et origine [Rapport]. - [s.l.] : INERIS Bordeaux 1, 2006.
- ANSES** Étude exploratoire du coût socio-économique des polluants de l'air [Rapport]. - 2014.
- Boldo E [et al.]** Apehis: Health Impact Assessment of Long-term Exposure to PM2.5 in 23 European Cities [Revue] // European Journal of Epidemiology. - 2006. - 6 : Vol. 21. - pp. 449-458.
- Cadle S H et Williams R L** Gas and particle emissions from automobile tyres in laboratory and field studies [Revue] // Rubber Chemistry and Technology. - 1978. - 1 : Vol. 52. - pp. 146-158.
- Cadle S H et Williams R L** Rubber Chemistry and Technology [Ouvrage]. - 1979. - Vol. 51.
- Camatini M [et al.]** Microcharacterization and identification of tyre debris in heterogeneous laboratory and environmental specimens [Revue] // Materials Characterization. - 2001. - Vol. 46. - pp. 271-283.
- Cardina J A** Rubber Chemistry and Technology [Ouvrage]. - 1974. - Vol. 47 : p. 1005.
- CITEPA** INVENTAIRE DES EMISSIONS DE POLLUANTS ATMOSPHERIQUES ET DE GAZ A EFFET DE SERRE EN FRANCE [Rapport]. - Paris : [s.n.], 2013.
- COMMISSION EUROPEAN PARTICULATES:**Characterisation of Exhaust Particulate Emissions from Road Vehicles [Rapport]. - 2004.
- Cristol-Bulthé A L [et al.]** Mechanical and chemical investigation of the temperature influence on the tribological mechanisms occurring in OMC/cast iron friction contact [Revue] // Wear. - 2008. - Vol. 264. - pp. 815-825.
- Donaldson K et Borm P** Particle Toxicology [Ouvrage]. - [s.l.] : CRC Press, 2006. - p. 103.
- Garg B D [et al.]** Brake wear particulate matter emissions [Revue] // Environmental Science & Technology. - 2000. - 21 : Vol. 34. - pp. 4463-4469.
- Gehrig G [et al.]** Contribution of railway traffic to local PM10 concentrations in Switzerland [Revue] // Atmospheric Environment. - 2007. - Vol. 41. - pp. 923-933.
- Goodwin J W [et al.]** UK emissions of air pollutants 1970-2000 [Rapport] / National Atmospheric Emissions Inventory (NAEI), National Environmental Technology Centre (NETCEN). - Culham : [s.n.], 2002.
- Gustafsson M** VTI studies on non-exhaust particles [Rapport] / VTI ; Swedish National Road and Transport Research Institute. - 2013. - powerpoint presentation.
- Hildemann L M, Markowski G R et Cass G R** Chemical composition of emissions from urban [Revue] // Environmental Science and Technology. - 1991. - 4 : Vol. 25. - pp. 744-759.
- Hinds W C** Aerosol Technology [Section]. - New York : John Wiley & Sons, 1999. - 2nd.
- Howard Vyvyan** Statement of Evidence: Particulate Emissions and Health [Ouvrage]. - 2009.
- Johansson C et Johansson P** Particulate matter in the underground of Stockholm [Revue] // Atmospheric Environment. - 2003. - Vol. 37.

Kasem H [et al.] Independence between wear process, size of detached particles and CO₂ production during carbon/carbon composite friction [Revue] // *Wear*. - 2007. - Vol. 263. - pp. 1220-1229.

LeMatin Le parc français vieillit [Article] // *LeMatin*. - 25 06 2013.

Maynard D [et al.] Mortality Risk Associated with Short-Term Exposure to Traffic Particles and Sulfates [Revue] // *Environ Health Perspect.* . - 2007. - 5 : Vol. 115. - pp. 751-755.

Mohsen M, Blau p J et Dumitrescu D Characteristics and morphology of wear particles from laboratory testing of disk brake materials [Revue] // *Wear*. - 2004. - Vol. 256. - pp. 1128-1134.

Mühlfeld C [et al.] Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses [Revue] // *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. - 2008. - Vol. 294. - pp. 817-829.

Planetoscope: Statistique mondiale en temps réels [En ligne]. - 09 2014. - <http://www.planetoscope.com/recyclage-dechets/recyclage-collecte>.

Rogge W F [et al.] Sources of Fine Organic Aerosol. 3. Road dust, tyre debris, and organometallic brake lining dust: Roads as sources and sinks. [Revue] // *Environmental Science and Technology*. - 1993. - 9 : Vol. 27. - pp. 1892-1904.

Salma I, Weidinger T et Maenhaut W Time-resolved mass concentration, composition and sources of aerosol particles in a metropolitan underground railway station [Revue] // *Atmospheric Environment*. - 2007. - Vol. 41.

Sanders P G [et al.] Airborne brake wear debris: Size distributions, composition, and a comparison of dynamometer and vehicle tests [Revue] // *Environ Sci Technol*. - 2003. - Vol. 37. - pp. 4060-4069.

Sundh J et Olofsson U Relating contact temperature and wear transitions in a wheel-rail contact [Revue] // *Wear*. - 2011. - Vol. 271. - pp. 78-85.

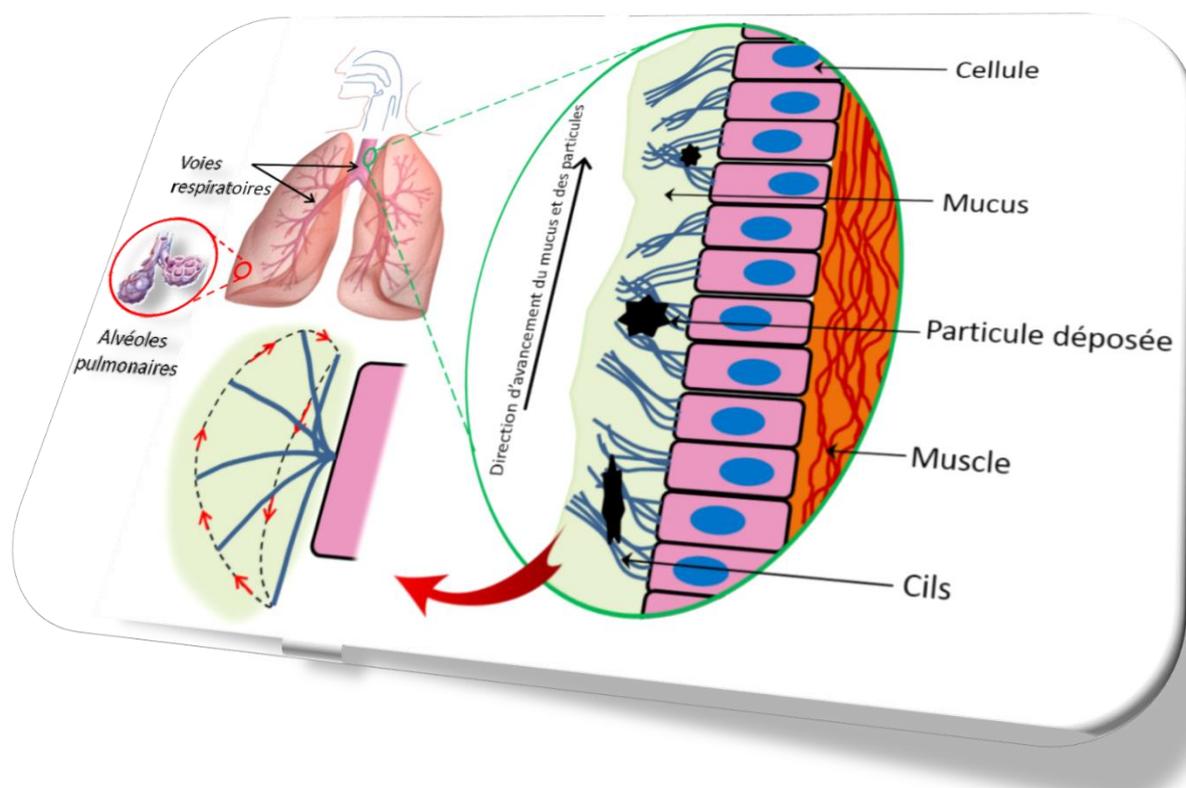
Tomiyasu B [et al.] TOF-SIMS measurement for the complex particulate matter in urban air environment [Revue] // *Applied Surface Science*. - 2004. - 231-232. - pp. 515-519.

Wiki Wikibooks, "Tribologie-Usure des surface" [En ligne]. - 2006. - <http://fr.wikibooks.org/wiki/Tribologie>.

Wiki Wikipedia, the Free Encyclopedia [En ligne]. - 2014. - 09 2014. - <http://en.wikipedia.org/wiki/Wear>.

LES POUMONS ET LES VOIES RESPIRATOIRES :

Organes "cible" pour les particules aéroportées



Chapitre B

LES POUMONS ET LES VOIES RESPIRATOIRES: *ORGANES «CIBLE» POUR LES PARTICULES AEROPORTEES*

Cette thèse vise à analyser les mécanismes d'interaction des particules d'usure aéroportées avec le surfactant pulmonaire afin d'identifier la relation entre les paramètres, les grandeurs décrivant les particules et leur effets sur le fonctionnement normal du surfactant pulmonaire, c'est-à-dire leur « toxicité ».

Dans ce contexte, ce chapitre a pour but de faire une synthèse bibliographique sur les principales caractéristiques du système respiratoire. Il commencera par quelques rappels anatomiques des poumons et des voies respiratoires et continuera avec les mécanismes de filtration, dépôt et élimination des particules aéroportées inhalées à tous les étages du système respiratoire.

Table des matières

B.1 La respiration et les fonctions pulmonaires	18
B.2 Les poumons – la première ligne de défense.....	18
B.3 Les voies respiratoires - organe cible pour les particules inhalées	19
B.3.1 La zone de conduction - généralités	20
B.3.2 La zone de conduction – mécanismes de dépôt des particules	22
B.3.3 La zone intermédiaire - généralités.....	23
B.3.4 La zone intermédiaire – mécanismes de dépôt des particules.....	23
B.3.5 La zone respiratoire - généralités.....	24
B.3.6 La zone respiratoire – mécanismes de dépôt des particules	25
B.3.6.1 La diffusion brownienne.....	26
B.3.6.2 Les forces électrostatiques.....	26
B.4 Les mécanismes de défense : élimination des particules	28
B.4.1 Les mécanismes physiques de défense.....	28
B.4.2 Les mécanismes immunologiques de défense.....	29
B.5 Le réponse des voies respiratoires au dépôt des particules inhalées.....	30
B.4.3 Réponses non-carcinogéniques	30
B.4.4 Réponses carcinogéniques	31
B.5 Conclusions préliminaires	32
Travaux cités	34

B.1 La respiration et les fonctions pulmonaires

La **respiration** est un mécanisme complexe qui a pour but l'oxygénation des tissus et l'élimination du gaz carbonique (dioxyde de carbone) issu des processus respiratoires. Cette fonction est exercée par les poumons qui réalisent les mouvements d'inspiration et d'expiration. La respiration est possible grâce au diaphragme musculaire⁸ qui se trouve au bas de la cage thoracique. La contraction de ce muscle détermine l'augmentation du volume des poumons et la diminution de la pression ce qui détermine la pénétration de l'air dans les voies respiratoires. A chaque inspiration, avec la pénétration de l'air, des milliers des particules pénètrent aussi dans les poumons où elles sont déposées et retenues pour différentes périodes de temps et par différents mécanismes. Les mécanismes de dépôt des particules sont : l'interception, la collision, la sédimentation, et la diffusion qui vont être décrites dans le sous-chapitre A.2.1. Ces mécanismes sont dépendants à la fois des particularités anatomiques des voies respiratoires (le diamètre, la présence des cils⁹, le surfactant pulmonaire etc.) et à la fois des paramètres physiques des particules (taille, morphologie, propriétés de surface etc.). C'est justement dans ce contexte que le poumon exerce aussi des **fonctions d'épuration** (élimination des particules pénétrant dans les voies respiratoires) (Goerke, 1974) (Murray, 2010) (Creuwels, et al., 1997). Par la suite, les particularités anatomiques des poumons et des voies respiratoires qui pourront être déterminants dans le dépôt et la rétention des particules inhalées vont être présentés.

Il faut mentionner que le poumon exerce aussi d'autres fonctions comme par exemple des **fonctions métaboliques** (rôle particulier joué par les cellules endothéliales¹⁰) (*Académie de Médecine, 2014*), mais qui ne font pas l'objet de ce chapitre qui est plutôt orienté vers les mécanismes de respiration et d'épuration.

B.2 Les poumons – la première ligne de défense

L'individu normal possède deux poumons (Fig.1). Ce sont des organes spongieux. Chacun a une face externe convexe située contre la paroi thoracique, et une face interne concave. Leur base concave repose sur le diaphragme, et leur sommet (appelle apex) remonte jusqu'à la base du cou. Les poumons sont séparés par une structure appelée médiastin¹¹ ainsi que par le cœur, et ils sont limités par la cage thoracique qui les entoure. Le poumon droit est sensiblement plus lourd (650 à 700 grammes) que le gauche (550 à 600 grammes) mais leur taille, et leur poids varient d'un individu à l'autre (*Lebeau, 1989*) (*Grand-Perret, 2005*). Le poumon est composé de trois phases: l'air, les tissus et les vaisseaux sanguins. Le tissu forme une barrière complète entre l'air et le sang; il est constitué d'un réseau stable, alors que l'air et le sang sont continuellement échangés. Cette structuration des poumons est connu depuis longtemps mais, le développement de la microscopie électronique et des techniques morphologiques quantitatives (morphométrie 3D) ont élargi la compréhension générale sur la structuration du poumon et ont posé les bases d'une approche plus fonctionnelle (*Rodriguez, et al., 1987*) (*Haefeli-Bleuer, et al., 1988*). En revanche, la microarchitecture du tissu pulmonaire n'est pas l'objectif de ce chapitre, qui est plutôt orienté sur les mécanismes de filtration des particules. Toutefois, à cet égard, pour couvrir tous les aspects, le lecteur est renvoyé à la littérature

⁸ Le diaphragme est un muscle qui forme une coupole au-dessus des organes de l'abdomen et qui les sépare des organes situés dans le thorax. Outre ce rôle séparateur, le diaphragme est le moteur principal de la respiration

⁹ Prolongements cellulaires organisés en rangées sur la surface cellulaire.

¹⁰ Revêtement interne des vaisseaux sanguins formée d'une seule couche de cellules minces, aplaties et très lisses qui constituent une surface d'écoulement idéale pour le sang.

¹¹ Partie centrale de la cage thoracique située entre les 2 poumons

spécialisée (Macklem, et al., 1988) (Itoh, et al., 2004). Ainsi, la partie suivante de ce chapitre sera focalisée plutôt sur la hiérarchisation des voies respiratoires à partir de la trachée vers les alvéoles pulmonaires.

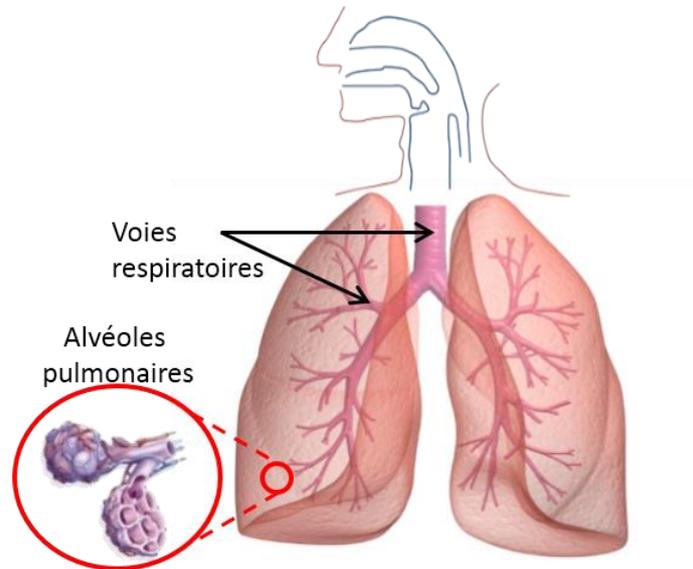


Fig. 1 Représentation schématique des poumons humains.

B.3 Les voies respiratoires - organe cible pour les particules inhalées

Les voies respiratoires sont des tuyaux qui se divisent vers la périphérie des poumons selon le principe de dichotomie irrégulière¹² (Sato, et al., 1996). Ces tuyaux transportent l'air riche en oxygène à l'intérieur des poumons vers les alvéoles pulmonaires (où les échanges gazeux se réalisent) (Weinberger, et al., 2014). Ils transportent également le dioxyde de carbone, un gaz résiduaire, des alvéoles pulmonaires vers l'extérieur. Les voies respiratoires incluent (Fig.2) :

- la cavité nasale,
- la bouche,
- le larynx,
- la trachée,
- les bronches,
- les bronchioles,
- les canaux alvéolaires,
- les sacs alvéolaires qui se finissent par les alvéoles pulmonaires.

D'un point de vue fonctionnel l'organisation des voies respiratoires peuvent être représentée en trois zones principales (Shields, et al., 2005), chacune incluant plusieurs divisions appelés « générations » G comme présenté dans la figure 2 où on peut distinguer, la zone :

- de conduction - à partir de la trachée vers les bronchioles. Comme son nom l'indique, cette zone a le rôle de conduire et distribuer de l'air dans les unités pulmonaires périphériques,
- respiratoire - incluant les sacs alvéolaires et les alvéoles pulmonaires, est la zone où l'échange gazeux se réalise,

¹² Les deux branches provenant d'une branche mère peuvent varier considérablement en longueur et en diamètre

- de transition – est la zone qui fait la transition entre la zone de conduction et la zone respiratoire incluant à la fois des éléments de conduction (bronchioles terminales) et des éléments respiratoires (bronchioles respiratoires et canaux alvéolaires).

Le diamètre des voies respiratoires diminue progressivement de la zone de conduction vers la zone respiratoire comme il est montré sur la figure 3 (*Haefeli-Bleuer, et al., 1988*) qui représente la variation du diamètre moyen des voies respiratoires en fonction de la génération. Cela déterminera une filtration et un dépôt progressif des particules inhalées en fonction de leur taille.

Par la suite une description succincte des zones fonctionnelles des voies respiratoires, en s'appuyant sur les mécanismes de sédimentation des particules aéroportées sera présentée.

B.3.1 La zone de conduction - généralités

La zone de conduction contient les voies respiratoires qui ont le rôle de conduire et distribuer l'air vers la zone de transition et la zone respiratoire. Comme on peut l'observer sur la figure 2 cette zone commence par la cavité nasale, la trachée, les bronches (souches, lobaires, segmentaires, sous-segmentaires, petites) et se finit avec les bronchioles. De la trachée vers les bronchioles, la structure des voies aériennes se transforme progressivement. Par exemple, le cartilage hyalin trouvé dans la structure de la trachée et des bronches disparaît vers les bronchioles. Toutefois, commun à tous est le schéma général d'une paroi à trois couches : une couche interne constituée par un tissu épithélial¹³ avec des cils, une couche intermédiaire de muscles et une enveloppe de tissu conjonctif¹⁴. Toutes ces couches, mais notamment la couche interne, ont le rôle d'humidifier et de réchauffer l'air inhalé avant qu'il arrive dans la zone respiratoire très sensible.

¹³ Tissu constitué de cellules étroitement juxtaposées (ou jointives), sans interposition de fibres.

¹⁴ Tissu dont les cellules sont séparées par de la matrice extracellulaire qui contient de fibres (exemple : le cartilage)

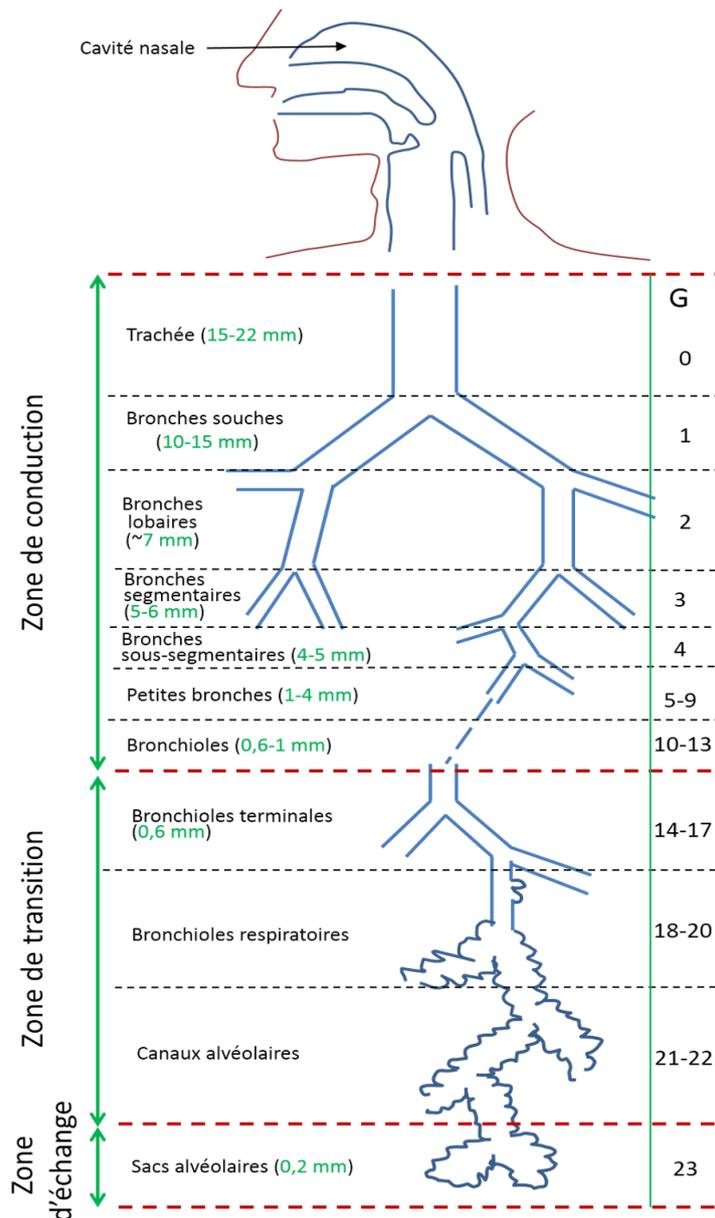


Fig. 2 Représentation schématique de la séquence des branches des voies respiratoires en fonction de la « Génération » G. Adapté de (Weibel, 1963)

En outre, les polluants atmosphériques comme les particules aéroportées, aussi que des micro-organismes en suspension potentiellement nocifs, doivent être «filtrés» ce qui permet l'obtention d'un air de «bonne qualité» au niveau alvéolaire.

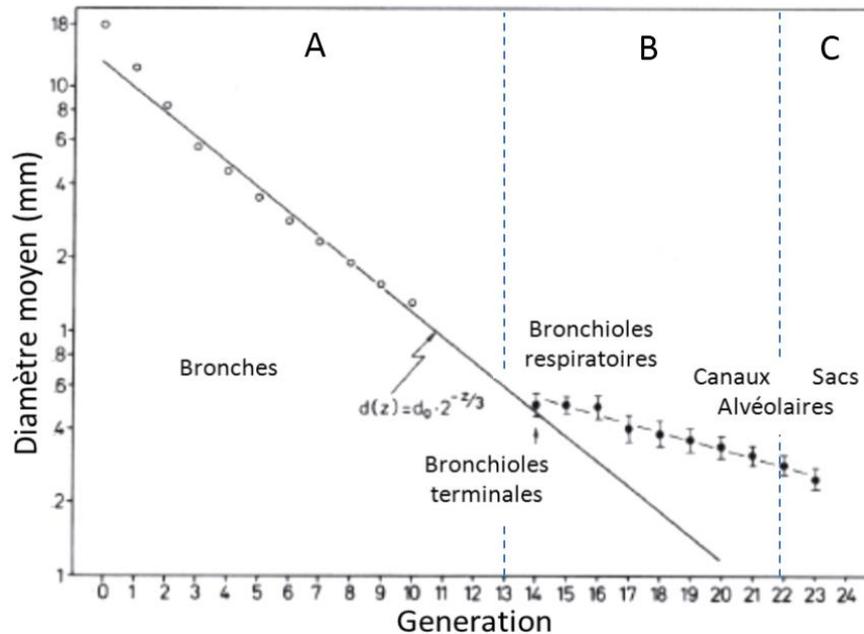


Fig. 3 Réduction progressive du diamètre moyen des voies aériennes en fonction de la « Génération » Adapté du (Haefeli-Bleuer, et al., 1988) A. La zone de conduction, B. La zone intermédiaire, C. La zone respiratoire.

B.3.2 La zone de conduction – mécanismes de dépôt des particules

L'efficacité de filtration de l'air inhalée résulte de la combinaison du diamètre des voies aériennes avec les autres mécanismes de défenses physiques comme par exemple la présence et le mouvement des cils, l'éternuement, la toux etc. Ainsi, les particules avec des diamètres aérodynamiques supérieures à $2 \mu\text{m}$ se déposent dans cette zone de conduction où le courant d'air est plus élevé. Les particules avec un diamètre aérodynamique supérieures à $10 \mu\text{m}$ sont déposées dans le nez ou la gorge par **collision** (Svartengren, et al., 1989) (Gehr, et al., 2000) et ne peuvent pas pénétrer dans les voies respiratoires inférieures. La collision des particules avec la paroi des voies respiratoires se passe à cause des courants d'air élevés. En effet, lors d'un «virage» dans le système des voies respiratoires, les particules inhalées qui ont tendance à circuler selon leur trajectoire initiale, rencontreront les parois internes des voies respiratoires (Fig. 4). La probabilité qu'une particule avec un diamètre d et une densité ρ qui circule avec la vitesse u au long du courant d'air dans les voies respiratoires, déviera de sa trajectoire, est donnée par le nombre de Stokes (Stk) :

$$Stk = \frac{\rho * d * u}{18 * \eta * A} \quad (1)$$

Où A est un paramètre qui caractérise la géométrie des voies respiratoires. Plus le nombre de Stokes est grand plus la particule tend à dévier de la trajectoire de courant d'air et par conséquence d'être déposé par collision.

Les particules d'un diamètre aérodynamique compris entre $2 \mu\text{m}$ et $10 \mu\text{m}$ sont déposées au niveau trachéo-bronchique par **collision** et **interception** (Gehr, et al., 2000). Une particule est déposée par interception quand elle se déplace très proche de la surface des voies respiratoire de telle façon qu'elle vient en contact avec la surface (Fig. 4). C'est le cas des particules aéroportées sous forme de fibre.

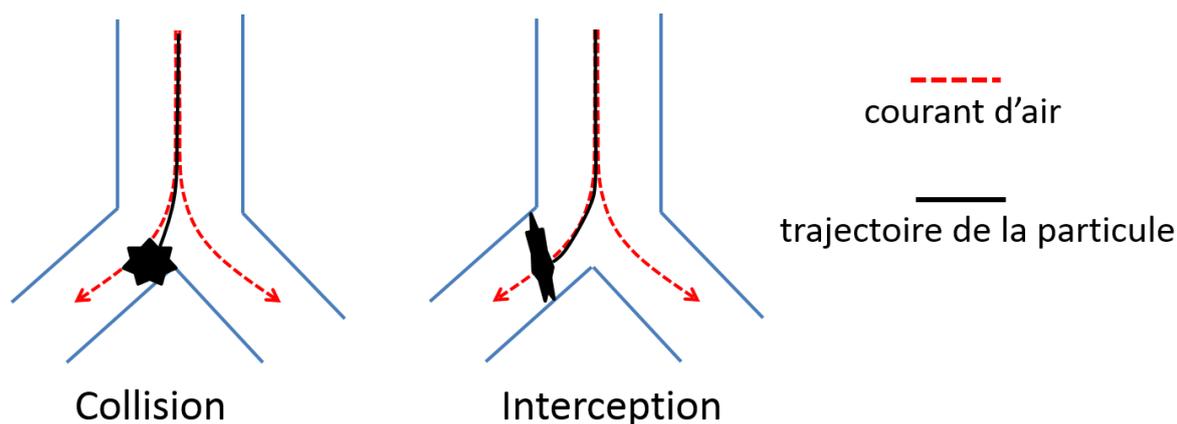


Fig. 4 Les mécanismes de dépôt des particules dans les voies respiratoires par **Collision** et **Interception**

Toujours dans la zone de conduction sont déposées aussi une partie des particules d'un diamètre aérodynamique inférieur à $2\ \mu\text{m}$ mais la plupart de ces particules arrive jusqu'à la zone intermédiaire.

B.3.3 La zone intermédiaire - généralités

C'est la zone qui fait la transition entre la zone de conduction et la zone respiratoire incluant à la fois des éléments de conduction (bronchioles terminales) et des éléments respiratoires (bronchioles respiratoires et canaux alvéolaires) où les échanges gazeux se produisent. Les bronchioles terminales sont les dernières voies respiratoires avec un rôle exclusivement de conduction. Elles se divisent donnant naissance aux trois générations des bronchioles respiratoires, qui ont la même structure (en trois couches) que les bronchioles respiratoires sauf que la continuité de leur paroi est interrompue par des régions de tissu d'échange qui sera décrit dans la section suivante. Le diamètre de ces voies respiratoires varie entre $0.6\ \text{mm}$ pour les bronchioles terminales et $0.2\ \text{mm}$ pour les sacs alvéolaires.

B.3.4 La zone intermédiaire – mécanismes de dépôt des particules

A ce niveau sont déposées les particules d'un diamètre aérodynamique compris entre 2 et $1\ \mu\text{m}$. Le mécanisme de dépôt est cette fois-ci la **sédimentation** (Darquenne, et al., 2004) (Heyder, 2004). Par exemple, en se déplaçant dans les voies respiratoires comme les bronchioles, dont le diamètre est petit et le courant d'air faible, la force de gravité qui agit sur particule et la résistance de l'air peuvent vaincre la force d'Archimède (qui maintient sa flottabilité) ce qui détermine sa sédimentation sur les parois internes des voies respiratoires (Fernández, et al., 2012).

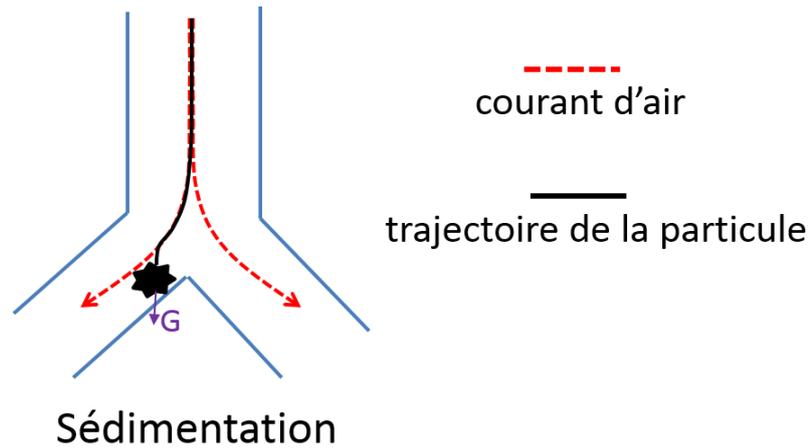


Fig. 5 Le mécanisme de dépôt des particules dans les voies respiratoires par **Sédimentation**.
G est la force de gravité qui agit sur la particule

Ce phénomène est décrit par la loi de Stokes (Gehr, et al., 2000) (Crowder, et al., 2002). Par exemple, pour une particule d'un diamètre d et densité ρ cette loi peut s'écrire :

$$\left(\frac{\pi}{6}\right) * \rho * d^3 * g = 3 * \pi * \eta * d * v \quad (2)$$

La force de gravité qui agit sur la particule est caractérisé par le terme gauche de l'équation, où g est l'accélération gravitationnelle. Le terme droit représente la force résistive, dans laquelle η est la viscosité dynamique du milieu. Le terme v représente la vitesse de sédimentation qui donne la probabilité de dépôt de la particule (Gad, 2012). Tenant compte que ce type de mécanisme de dépôt est spécifique pour les particules d'un diamètre aérodynamique inférieur à $2 \mu\text{m}$, un facteur de correction C_s (Crowder, et al., 2002) est nécessaire pour prendre en compte la diminution de la résistance de l'air due au glissement à la surface de la particule lorsque la taille de la particule est très faible (Darquenne, et al., 2004) (Gad, 2012) :

$$v = \frac{\rho * d^2 * g * C_s}{18 * \eta} \quad (3)$$

On peut observer que l'introduction de ce facteur de correction détermine une vitesse de sédimentation v plus grande que celle prédite par la loi de Stokes. Le taux de dépôt des particules augmente quand le flux d'air est laminaire et diminue quand le flux d'air est turbulent. Ainsi, le dépôt de particules par sédimentation est prépondérant dans l'apnée¹⁵ qui survient juste après l'inhalation, car la vitesse de l'air dans les voies respiratoires est minimale et le flux d'air est laminaire. Toutefois, ce type de mécanisme de dépôt n'est pas un facteur important lorsque le diamètre aérodynamique des particules est inférieur à $1 \mu\text{m}$.

B.3.5 La zone respiratoire - généralités

La zone respiratoire des voies respiratoires est constituée par trois structures optimisées pour les échanges gazeux: les canaux alvéolaires sur lesquelles s'ouvrent les sacs alvéolaires. Les sacs alvéolaires contiennent plusieurs alvéoles pulmonaires. (Fig.6b) (Weibel, 1963). Les alvéoles pulmonaires sont de minces sacs creux avec un rayon d'environ 0.3 mm et une

¹⁵ Arrêt momentané de la respiration

épaisseur de paroi d'environ $0,3 \mu\text{m}$. L'homme possède environ 300 à 400 millions d'alvéoles représentant une surface de 150 m^2 . C'est là que se déroulent les échanges gazeux (O_2 et CO_2) entre l'air et le sang circulant comme il est montré sur la figure 6a qui présente de manière schématique une alvéole pulmonaire entouré d'un vaisseau sanguin. La figure 6b montre également une image de microscopie électronique à balayage des alvéoles pulmonaires. Les parois qui délimitent les alvéoles pulmonaires contiennent des capillaires et un espace interstitiel¹⁶ très petit. Dans certaines parois alvéolaires il y a des pores entre les alvéoles. Il y a deux types majeurs de cellules alvéolaires dans la paroi alvéolaire :

- cellules plates: les pneumocytes membraneux ou **pneumocytes de type I** formant la structure de la paroi alvéolaire, reliés entre eux par des jonctions serrées¹⁷ ;
- pneumocytes granuleux ou **pneumocytes de type II** qui se divisent pour produire le type I de cellules. Les pneumocytes de type II sécrètent un surfactant qui a un rôle essentiel dans la respiration et la défense et qui sera décrit plus en détail dans le chapitre C.

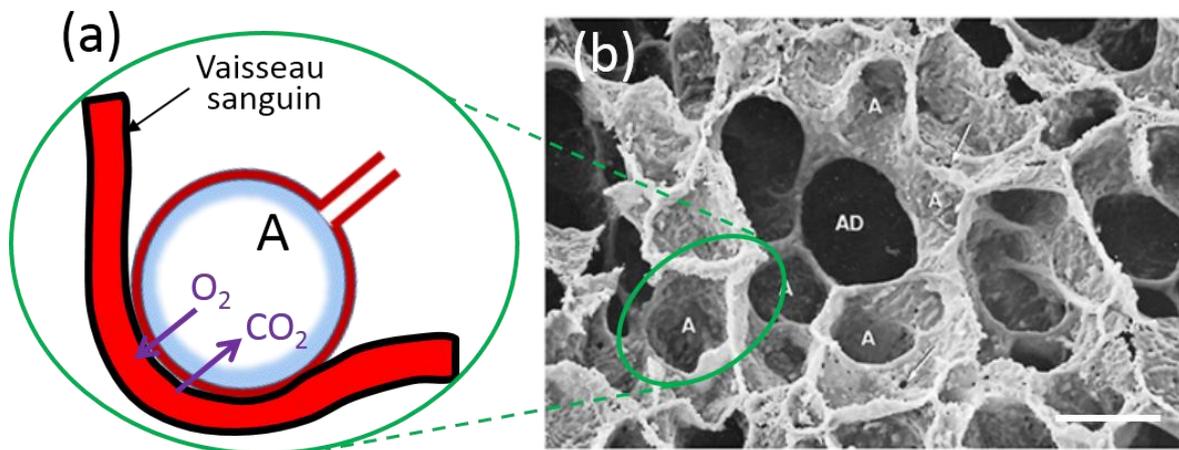


Fig. 6 (a) représentation schématique d'une alvéole pulmonaire entouré d'un vaisseau sanguin. (b) Image de microscopie électronique à balayage des alvéoles pulmonaires. Modifié de (Weibel, 1963). Barre d'échelle $\sim 200 \mu\text{m}$. A=alvéoles pulmonaires, AD=canaux alvéolaires (anglais : «alveolar ducts»)

B.3.6 La zone respiratoire – mécanismes de dépôt des particules

Les particules qui pénètrent à ce niveau ont des tailles inférieures à $1 \mu\text{m}$ et du fait de leur petite taille sont susceptibles d'être influencés par des phénomènes physiques comme la diffusion brownienne et les forces électrostatiques. C'est pour cela que les principaux mécanismes de dépôt des particules dans la zone respiratoire sont **la diffusion brownienne** et les **forces électrostatiques** schématisé sur la figure 7.

¹⁶ L'espace entre le capillaire sanguin et la paroi externe des alvéoles pulmonaires, à travers laquelle se font les échanges gazeuses.

¹⁷ Jonctions intercellulaires par l'intermédiaire des glycoprotéines adhésives. Il s'agit en quelque sorte d'une fermeture éclair qui empêche les molécules de s'infiltrer entre les cellules.

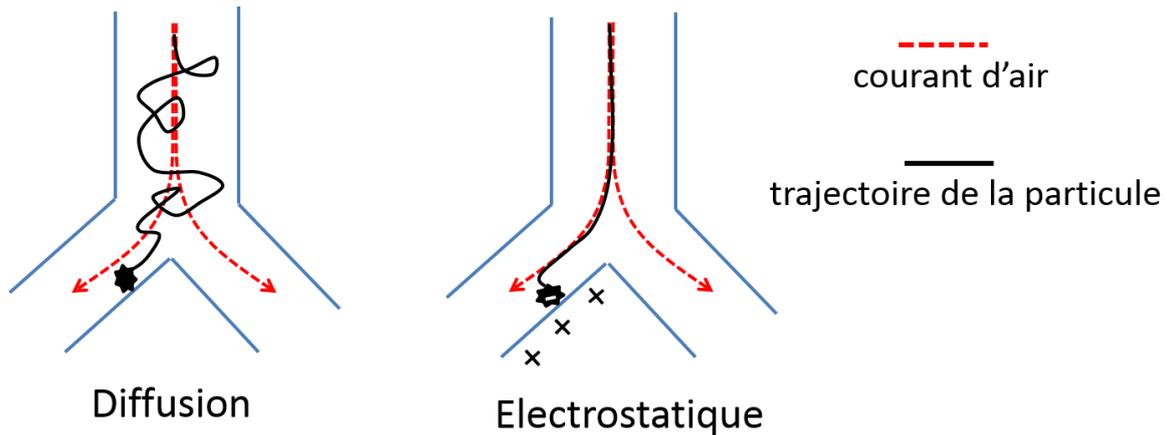


Fig. 7 Les mécanismes de dépôt des particules dans les voies respiratoires par **Diffusion** et **Forces électrostatiques**

B.3.6.1 La diffusion brownienne

La diffusion brownienne des particules aéroportées de petite taille est donnée par la collision aléatoire de celles-ci avec les molécules d'air. De ce fait, la trajectoire des particules change de direction brusquement lors d'une collision et par conséquent elle est non-déterministe. Il est donc évident que les trajectoires d'une particule en diffusion brownienne ne peuvent pas être prédites, toutefois, il est possible d'estimer la distance nette parcourue par la particule en diffusion brownienne dans un temps donné et par conséquent de déterminer la probabilité de dépôt des particules sur la paroi des voies respiratoires (Ingham, 1975)¹⁸ donné par (Gad , 2012):

$$\Delta = \frac{k * T * C_s * L}{3 * \pi * d * \eta * u * D} \quad (4)$$

Où k est la constante de Boltzmann¹⁹, T est la température exprimée en kelvin, L et D sont respectivement la longueur, le diamètre des voies respiratoires, u est la vitesse moyenne du flux d'air, η est la viscosité, d est le diamètre de la particule et C_s est le facteur de correction introduit auparavant pour prendre en compte la diminution de la résistance de l'air due au glissement à la surface de la particule lorsque la taille de la particule est très faible. Comme dans le cas du dépôt par sédimentation, on observe que la probabilité de dépôt des particules par diffusion augmente avec la diminution de la vitesse d'air u dans les voies respiratoires. Ainsi, le dépôt des particules par diffusion est favorisé dans les étages inférieures des voies respiratoires comme par exemple dans les alvéoles pulmonaires où la vitesse de circulation d'air est minime. Il faut aussi noter que la probabilité de dépôt par diffusion augmente avec la diminution de la taille des particules (diamètre d) contrairement au dépôt par collision ou sédimentation dont la probabilité augmente avec le diamètre des particules (équations 1 et 3).

B.3.6.2 Les forces électrostatiques

Les mécanismes de dépôts décrits jusqu'ici ont été largement étudiés. Plusieurs excellentes revues sur ces aspects sont disponibles dans la littérature (Gehr, et al., 2000) (Rom, et al., 2006)

¹⁸ Dans Ingham, 1975 pour le calcul du Δ les voies respiratoires ont été considérées comme des tubes cylindriques.

¹⁹ La constante de Boltzmann $k = 1,3806488 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$

(Geiser, et al., 2010) (Hussain, et al., 2011) (Fernández, et al., 2012) . En revanche, très peu d'informations existent sur le **dépôt due à la présence des charges électriques**, bien qu'il ait été montré que la plupart des particules aéroportées sont électriquement chargées (Johnston, et al., 1985). En effet, des études expérimentales *in vivo* ont déjà montré une augmentation du taux de dépôt des particules par des attractions électrostatiques (Melandri, et al., 1975) (Ferin, et al., 1983) (Chan, et al., 1978) suggérant que le dépôt des particules dû aux forces électrostatique est un aspect très important. Dans ce contexte, la physique de dépôt des particules chargées électriques sera présentée par la suite.

En effet, deux forces de nature électrostatique pourraient être responsables du dépôt des petites particules chargées dans les alvéoles pulmonaires (Yu, 1985) :

1. la force électrostatique agissant entre la particule chargée et les parois des alvéoles pulmonaires,
2. la force donnée par la répulsion électrostatique entre les particules de même charge électrique qui pourrait influencer leur trajectoire et donc favoriser leur contact avec les parois alvéolaires.

Tandis que la première force ne dépend que des propriétés surfaciques de la particule/surface alvéolaire, la deuxième force dépend aussi de la concentration des particules dans les alvéoles. Pour déterminer laquelle de ces forces est prédominante et déterminante dans le dépôt, le comportement physique d'une particule chargée doit être connu. Ainsi, si on considère une particule sphérique de charge connue q en présence d'un champ électrique E , la force électrique qui agit sur la particule est

$$F_e = q * E \quad (5)$$

et qui impose à la particule une vitesse

$$u = B * q * E \quad (6)$$

où B est mobilité de la particule. Par exemple, pour une particule sphérique de diamètre d , la mobilité est donné par :

$$B = \frac{C_s}{3 * \pi * \eta * d} \quad (7)$$

C_s étant évidemment le facteur de correction introduit auparavant et η la viscosité du milieu.

La vitesse u donné par la force électrique détermine la probabilité de dépôt. En revanche, cette probabilité ne tient pas compte de la concentration des particules dans les alvéoles et donc de la force de répulsion entre les particules de même charge électrique. Pour prendre en compte ces effets, Yu et al. (Yu, 1985) (Yu, et al., 1977) ont calculé la distance moyenne entre les particules en fonction du diamètre des voies aériennes et de la concentration des particules. Ainsi, par exemple, pour une concentration des particules de $N = 10^5 \text{ particules/cm}^3$ la distance moyenne entre les particules est de $N^{-1/3} = 210 \mu\text{m}$. Par conséquent, dans la zone de conduction, dont le diamètre des voies respiratoires est plus grand que la distance moyenne entre les particules, la force électrostatique prédominante dans la probabilité de dépôt des petites particules aéroportées chargées, est la force qui agit entre la particule et la paroi alvéolaire. La force de répulsion entre les particules de même charge électrique est négligeable. En revanche, dans la zone respiratoire, dont le diamètre des voies respiratoires est du même ordre de grandeur

que la distance moyenne entre les particules, les deux types de forces sont prédominants dans la probabilité de dépôt des particules aéroportées chargées.

B.4 Les mécanismes de défense : élimination des particules

Les voies respiratoires et le système respiratoire en général ont un nombre limité de mécanismes de défense contre les particules déposées. Les premiers mécanismes de défense sont destinés à éliminer les particules déposées dans les voies respiratoires. Cela peut être fait par des mécanismes :

1. physiques,
2. immunologiques²⁰.

B.4.1 Les mécanismes physiques de défense

Les mécanismes physiques de défense concernent plutôt les voies respiratoires de la zone de conduction et inclut le couplage entre la présence du mucus, le mouvement des cils et la toux. Les cils sont des prolongements cellulaires organisés en rangées sur les cellules qui forment les parois internes des certaines voies respiratoires. Les cellules cillées²¹ sont réparties de la trachée aux bronchioles. Elles possèdent sur leur sommet environ 200 cils, qui forment un tapis qui oscille et entraîne par des vagues la propulsion du mucus²² qui les recouvre comme schématisé sur la figure 8. La propulsion du mucus qui emprisonne les particules et autre impuretés se fait dans une seule direction, en remontant vers les voies aériennes supérieures (pharynx) où il peut être dégluti ou expectoré par le mécanisme de toux. Il a été montré que chez un individu sain les particules sont éliminées par ces mécanismes dans les 24 heures après le dépôt dans la trachée et dans les bronches ((ICRP), 1994). Toutefois, le taux d'élimination des particules par des mécanismes physiques diminue vers les voies respiratoires inférieures.

²⁰ L'immunologie est la branche de la biologie qui s'occupe de l'étude du système immunitaire. Le système immunitaire d'un organisme est un système biologique constitué d'un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance et de défense qui discrimine le « soi » du « non-soi ». Ce qui est reconnu comme non-soi est détruit, comme les pathogènes : virus, bactéries, parasites, certaines particules ou molécules « étrangères » (dont certains poisons)

²¹ Cellules qui contiennent des cils

²² Le mucus est une sécrétion visqueuse et translucide, peu ou assez peu soluble dans l'eau, produite par les glandes spécifiques des voies respiratoires

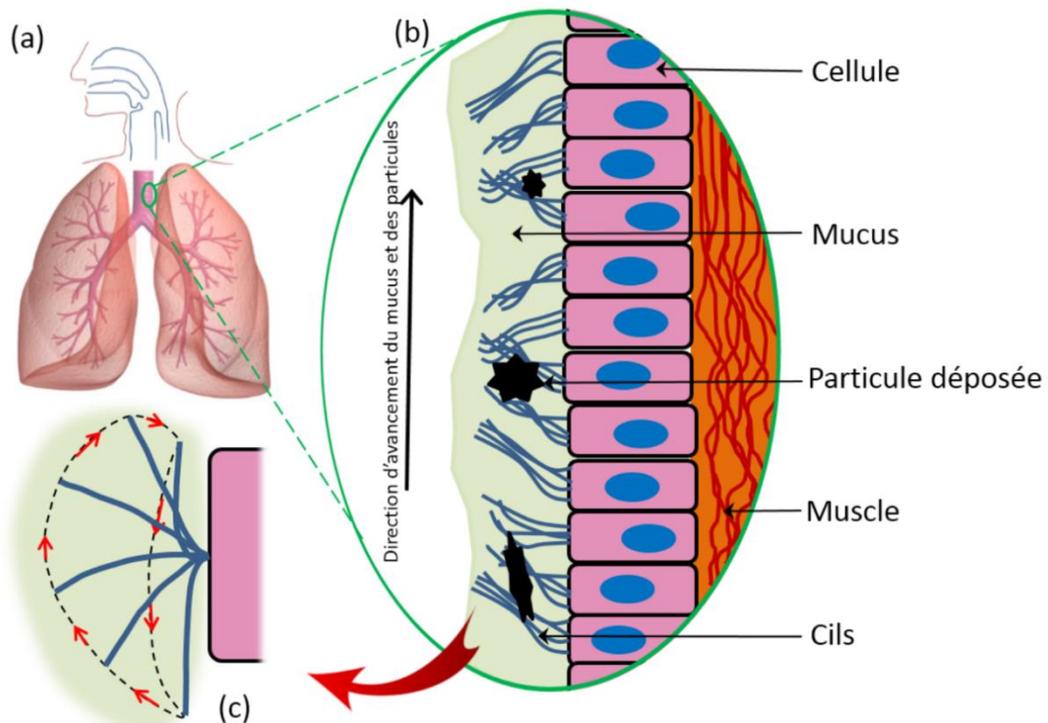


Fig. 8 Les mécanismes physiques de défense contre les particules aéroportées déposées dans les voies respiratoires. (a) : schéma des voies respiratoires, (b) : appareil muco-ciliaire, (c) : motilité ciliaire. Adapté de (Blauses)

En plus de son rôle dans la propulsion des particules, le mucus a aussi un rôle immunologique dont nous parlerons par la suite.

B.4.2 Les mécanismes immunologiques de défense

Les poumons sont équipés aussi des mécanismes de défense immunologiques qui sont exercées par différentes structures (Mühlfeld, et al., 2008) comme le mucus (ou le surfactant pulmonaire dans les alvéoles, dont on parlera dans le chapitre C), l'épithélium et les cellules de défense comme les macrophages²³.

Les macrophages représentent environ 90% de la totalité des cellules immunitaires du système respiratoire. Ils se situent surtout au niveau alvéolaire où ils ont des rôles très importants dans la défense contre les particules aéroportées (les parois des alvéoles pulmonaires étant dépourvues de tapis muco-ciliaire). Par des mécanismes complexes, bien décrits dans la littérature spécialisée (Aderem, et al., 1999) (Flannagan, et al., 2009), les macrophages reconnaissent et absorbent par phagocytose les particules déposées dans les voies respiratoires et dans les alvéoles pulmonaires. Puis, une partie d'entre eux va remonter jusqu'au voies respiratoires supérieures (grâce au tapis muco-ciliaire) pour leur évacuation, et une partie (ceux qui se trouvent au niveau alvéolaire) traversent les parois des alvéoles pulmonaires (processus appelé translocation ou transgression) et vont passer dans le système lymphatique²⁴ ou dans les

²³ Les macrophages (du grec : « gros mangeur », makros = grand, phagein = manger). Il est localisé dans des endroits stratégiques du corps pouvant être soumis à des infections ou à une accumulation de débris à éliminer (foie, poumons, ganglions lymphatiques etc.)

²⁴ Un réseau, à sens unique, de vaisseaux lymphatiques (dit réseau lymphatique), dont les vaisseaux naissent dans les différents tissus du corps pour rejoindre les ganglions, qui permettent la circulation et le nettoyage de la lymphe et dans une certaine mesure la clairance de particules insolubles

vaisseaux sanguins. **L'épithélium** des voies respiratoires est une autre structure qui joue un rôle dans les mécanismes de défense immunologiques contre les particules. Il secrète des substances chimiotactiques²⁵ pour les autres cellules du système immunitaire, comme les macrophages. En plus, il est impliqué dans le processus de translocation des particules fines (< 0.1 µm) vers les vaisseaux sanguins et vers d'autres tissus. Ces processus de translocation et d'élimination des particules peuvent durer des années (Hussain, *et al.*, 2011).

Lorsqu'il y a une exposition répétée aux concentrations suffisamment grandes de particules aéroportées, les mécanismes physiques et immunologiques de défense sont saturés et des réactions inflammatoires prolongées peuvent être déclenchées. Ces réactions inflammatoires prolongées entraînent des réponses spécifiques du système respiratoires. Par la suite les réponses du système respiratoire à l'exposition prolongé aux particules aéroportées seront présentées.

B.5 Le réponse des voies respiratoires au dépôt des particules inhalées

Les réponses aux particules aéroportées vont de simples nuisances à la nécrose tissulaire et à la mort. Différents facteurs permettent de modifier les effets des particules aéroportées, la réponse finale de l'organisme étant le résultat de l'interaction de ces facteurs. Ces facteurs sont liés à :

1. l'hôte, comme par exemple :

- l'âge,
- l'état de santé,
- le sexe et d'autres facteurs génétiques.

2. l'environnement, comme par exemple :

- la concentration des particules aéroportées,
- la taille et la physico-chimie des particules, qui détermine la zone de dépôt,
- la durée et la fréquence d'exposition aux particules.

Suite à l'exposition répétée aux particules aéroportées deux types principaux de réponse du système respiratoire peuvent apparaître : les réponses **non-carcinogéniques** et les réponses **carcinogéniques**. Les paragraphes qui suivent décrivent ces deux types principaux de réponse du système respiratoire aux particules aéroportées.

B.4.3 Réponses non-carcinogéniques

La réponse inflammatoire du tissu pulmonaire qui résulte de l'interaction avec les particules aéroportées est la manifestation la plus claire et la plus documentée. Il a été montré par des études *in vivo* que l'exposition aux particules par instillation nasale induit une augmentation des cellules inflammatoires, des cytokines²⁶, des substances chimiotactiques (Diaz-Sanchez, *et al.*, 1997) et des neutrophiles, cellules spécifiques aux maladies respiratoires comme l'asthme, la bronchite et la rhinite allergique (Salvi, *et al.*, 1999). Dans ce contexte, les dernières publications d'épidémiologie et santé publique confortent les données toxicologiques (voir

²⁵ Substances chimiques libérées par une cellule (par exemple les cellules de l'épithélium dans notre cas) qui vont se fixer sur un récepteur particulier sur la cellule immunitaire. Cela va provoquer un signal qui va permettre à la cellule cible de migrer vers la zone de « danger ».

²⁶ Les cytokines (du grec cyto, cellule, et kinos, mouvement) sont des substances de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules et/ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction.

tableau 1 qui présente une synthèse sur la prévalence des maladies respiratoires non-carcinogéniques en France)

Maladie	Asthme	Bronchite	Rhinite allergique
Prévalence/100 000 habitants	5 800	3 500	25 000

Tableau 1 Prévalence des maladies respiratoires non-carcinogéniques en France dans la population générale (Afrite, et al., 2011) (Fuhrman, et al., 2009) (Bauchau, et al., 2004)

B.4.4 Réponses carcinogéniques

Le cancer du poumon est le cancer le plus meurtrier en France et en général la plupart de cas sont attribuées à l'inhalation des particules aéroportées de l'environnement. L'importance du cancer du poumon parmi les autres types du cancer est montrée sur la figure 9 qui met en évidence le taux de mortalité par année pour différents types de cancer.

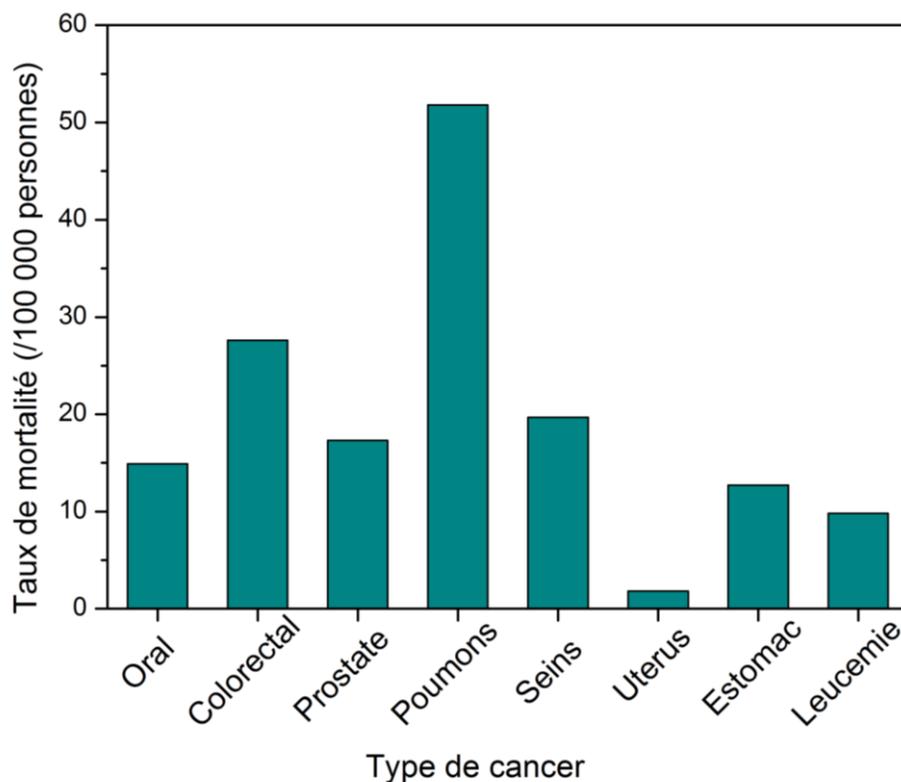


Fig. 9 Taux de mortalité pour 100 000 personnes (hommes et femmes) par année, pour différents types de cancer en France d'après (Wingo, et al., 1995)

Il devient donc de plus en plus évident, à travers les données toxicologiques et épidémiologiques, que les particules aéroportées posent des problèmes sanitaires particuliers et que la réglementation doit évoluer. Par ailleurs, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé l'ensemble des particules fines, ainsi que la pollution de l'air extérieur, comme des cancérigènes certains (groupe 1) pour l'homme. Toutefois il reste encore beaucoup d'inconnues sur le comportement de ces particules dans l'organisme.

B.5 Conclusions préliminaires

Comme nous avons pu lire, en plus de la respiration c'est-à-dire l'échange gazeux entre l'environnement extérieur, et celui intérieur du corps humain, les poumons jouent également le rôle d'un véritable filtre, qui par des mécanismes physiques et immunologiques filtrent plus de 10 000 litres d'air ambiant par jour. Cette fonction est très importante car l'air inspiré contient des microorganismes ou substances potentiellement nocifs et notamment des particules aéroportées. Ainsi, l'air contenant des particules est filtré et les particules sont déposées par différents mécanismes tout au long des voies respiratoires, principalement en fonction de certains paramètres comme par exemple:

- les propriétés des particules (taille, propriétés surfaciques),
- les particularités anatomiques des voies respiratoires (diamètre, présence des cils et mucus),
- la physiologie respiratoire (vitesse de l'air dans les voies respiratoires),
- le taux d'exposition aux particules.

Tous ces paramètres déterminent un dépôt comme sur la figure 10 qui présente une synthèse de travaux de (Zellweger, 21 sept 2007) (Hussain, et al., 2011) (Gehr, et al., 2000):

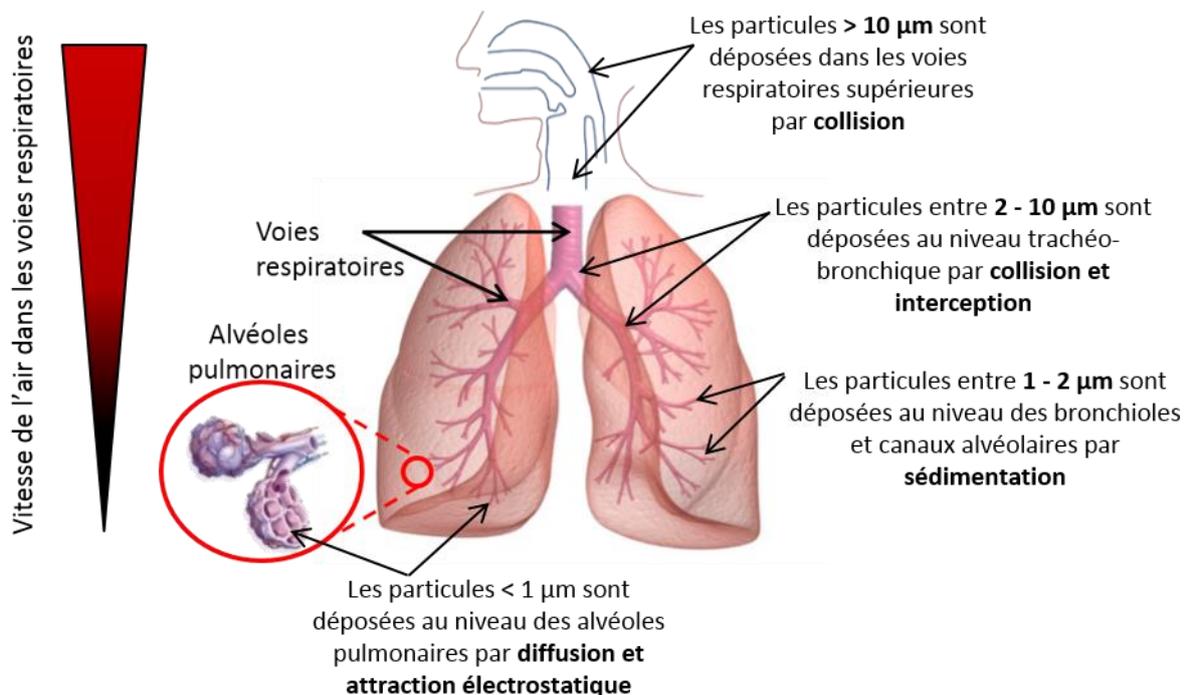


Fig. 10 Les principaux mécanismes de dépôt des particules sur la paroi des voies respiratoires en fonction de leur taille.

D'après (Zellweger, 21 sept 2007) (Hussain, et al., 2011) (Gehr, et al., 2000)

Malgré tous ces mécanismes complexes qui peuvent être considérées comme **la première barrière de défense** une fraction importante des particules aéroportées arrivent à franchir cette barrière. Dans ce cas **la deuxième barrière de défense** est activée. Celle-ci consiste dans un ensemble de mécanismes physiques et immunologiques qui ont le rôle d'éliminer les particules déposées dans les voies respiratoires. Les mécanismes physiques prédominent plutôt dans les voies respiratoires supérieures et sont exercées par l'appareil muco-ciliaire, tandis que les mécanismes immunologiques prédominent dans les voies respiratoires inférieures et consistent

à «engloutir» les particules par des macrophages et après les éliminer par translocation vers le système lymphatique ou sanguin, processus très lents qui peuvent durer des années. Il est donc évident que, chez un individu sain, il doit exister un équilibre entre le dépôt des particules dans les poumons et leur élimination par la deuxième barrière de défense. Cet équilibre est perdu lors de l'exposition répétée aux particules, notamment aux particules fines et ultrafines ($< 1 \mu\text{m}$) et ainsi des réponses spécifiques du système respiratoire peuvent apparaître. Ces réponses vont de simples nuisances, à la nécrose tissulaire et cancer pulmonaire et finalement à la mort de l'individu.

C'est justement dans ce contexte, que notre intérêt porte sur les particules qui perturbent cet équilibre et qui provoquent des réponses spécifiques graves du système respiratoire. C'est le cas des particules fines, ayant des tailles inférieures à $1 \mu\text{m}$ qui arrivent au niveau des alvéoles pulmonaires, où l'appareil muco-ciliaire est absent. Le seul mécanisme de défense est alors immunologique qui est très lent. Ainsi, les particules qui pénètrent jusqu'au niveau alvéolaire, sont très toxiques, même à des concentrations relativement faibles, à cause de leur petite taille et aux caractéristiques de surface comme il sera montré dans les chapitres qui suivent.

Travaux cités

- (ICRP) International Commission on Radiological Protection** Human respiratory tract model for radiological protection [Rapport] / Oxford. - [s.l.] : Elsevier Science, 1994.
- Académie de Médecine** Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2014. - [s.l.] : Académie de Médecine, 2014.
- Aderem A et Underhill D M** Mechanisms of phagocytosis in macrophages [Revue] // Annu Rev Immunol.. - 1999. - Vol. 17. - pp. 593-623.
- Afrite A [et al.]** L'asthme en France en 2006 : prévalence, contrôle et déterminants [Rapport] / Institut de recherche et documentation en économie de la santé. - 2011.
- Bauchau V et Durham S R** Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe [Revue] // The European Respiratory Journal. - 2004. - 5 : Vol. 24. - pp. 58-64.
- Blauses B** Wikiversity Journal of Medicine.
- Chan T L [et al.]** Effect of electrostatic charges on particle deposition in a hollow cast of the human larynx-tracheobronchial tree [Revue] // Journal of Aerosol Science. - 1978. - 5 : Vol. 9. - pp. 463–468.
- Creuwels L A, van Golde L M et Haagsman H P** The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects [Revue] // Lung. - 1997. - 1 : Vol. 175. - pp. 1-39.
- Crowder T M [et al.]** Fundamental Effects of Particle Morphology on Lung Delivery: Predictions of Stokes' Law and the Particular Relevance to Dry Powder Inhaler Formulation and Development [Revue] // Pharmaceutical Research. - 2002. - 3 : Vol. 19. - pp. 239-245.
- Darquenne C et Prisk G K** Aerosol Deposition in the Human Respiratory Tract Breathing Air and 80:20 Heliox [Revue]. - Journal of aerosol medicine : [s.n.], 2004. - 3 : Vol. 17. - pp. 278-285.
- Diaz-Sanchez D [et al.]** Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern [Revue] // Journal of Immunology. - 1997. - 5 : Vol. 158. - pp. 2406-2413.
- Ferin J, Mercer T T et Leach L J** The effect of aerosol charge on the deposition and clearance of TiO₂ particles in rats [Revue] // Environ Res.. - 1983. - 1 : Vol. 31. - pp. 148-151.
- Fernández A T et Casan P C** Deposition of Inhaled Particles in the Lungs [Revue] // Arch Bronconeumol. - 2012. - 7 : Vol. 48. - pp. 240-246.
- Flannagan R S, Cosío G et Grins S** Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies [Revue] // Nature Reviews Microbiology. - 2009. - Vol. 7. - pp. 355-366.
- Fuhrman C [et al.]** Bronchite chronique : prévalence et qualité de vie. Analyse des données de l'enquête santé Insee 2002-2003 [Revue] // Revue des Maladies Respiratoires. - 2009. - 7 : Vol. 26. - pp. 759-768.
- Gad S C** Development of Therapeutic Agents Handbook [Ouvrage]. - New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2012. - p. 567.
- Gehr P et Heyder J** Particle-Lung Interactions [Ouvrage]. - New York-Basel : Marcel Dekker INC., 2000. - p. 239.
- Geiser M et Kreyling W G** Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles [Revue] // Particle and Fibre Toxicology. - 2010. - 2 : Vol. 7. - pp. 1-17.
- Goerke J** Lung surfactant [Revue] // Biochim Biophys Acta.. - 1974. - Vol. 344. - pp. 241-261..
- Grand-Perret S** These: Syndrome de détresse respiratoire idiopathique du prématuré et aigue de l'adulte : intérêts thérapeutiques du surfactant pulmonaire exogène // FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANCON. - BESANCON : [s.n.], 2005.

- Haefeli-Bleuer B et Weibel E R** Morphometry of the human pulmonary acinus [Revue] // Anat Rec. - 1988. - 4 : Vol. 220. - pp. 401-414.
- Heyder J** Deposition of Inhaled Particles in the Human Respiratory Tract and Consequences for Regional Targeting in Respiratory Drug Delivery [Revue] // Proc Am Thorac Soc. - 2004. - Vol. 1. - pp. 15-320.
- Hussain M, Madl P et Khan A** Lung deposition predictions of airborne particles and the emergence of contemporary diseases Part [Revue] // TheHealth. - 2011. - 2 : Vol. 2. - pp. 51-59.
- Ingham D B** Diffusion of aerosols from a stream flowing through a cylindrical tube [Revue] // Journal of Aerosol Science. - 1975. - 2 : Vol. 6. - pp. 125-132.
- Itoh H, Nishino M et Hatabu H** Architecture of the lung: morphology and function [Revue] // J Thorac Imaging. - 2004. - 4 : Vol. 19. - pp. 221-227.
- Johnston A M, Vincent J H et Jones A D** Measurements of electric charge for workplace aerosols [Revue] // Annals of Occupational Hygiene. - 1985. - 2 : Vol. 29. - pp. 271-284.
- Lebeau B** Pneumologie [Ouvrage]. - Paris : Ellipses/Aupelf, 1989.
- Macklem P T et Mead J** Handbook of Physiology: Section 3: The Respiratory System [Ouvrage]. - [s.l.] : Oxford University Press, 1988. - Vol. III The Respiratory System.
- Melandri C [et al.]** On the deposition of unipolarly charged particles in the human respiratory tract [Revue] // Inhaled Particles. - 1975. - Vol. 4. - pp. 193-201.
- Mühlfeld C [et al.]** Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses [Revue] // American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. - 2008. - Vol. 294. - pp. 817-829.
- Murray J F** La structure et la fonction du poumon [Revue] // INT J TUBERC LUNG DIS. - 2010. - 4 : Vol. 14. - pp. 391-396.
- Peterson J B, Prisk G K et Darquenne C** Aerosol Deposition in the Human Lung Periphery Is Increased by Reduced-Density Gas Breathing [Revue] // J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. - 2008. - 2 : Vol. 21. - pp. 159-168.
- Rodriguez M [et al.]** Pulmonary acinus: geometry and morphometry of the peripheral airway system in rat and rabbit [Revue] // Am J Anat.. - 1987. - 2 : Vol. 180. - pp. 143-155.
- Rom W N et Markowitz S** Environmental And Occupational Medicine [Ouvrage] / éd. Wilkins Lippincott Williams and. - Philadelphia : [s.n.], 2006. - 4th Revised : p. 1904 pages.
- Salvi S [et al.]** Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers [Revue] // Am J Respir Crit Care Med.. - 1999. - 3 : Vol. 159. - pp. 702-709.
- Satoh K [et al.]** Regular and irregular dichotomies of bronchial branching in the human lung [Revue] // Acad Radiol.. - 1996. - 6 : Vol. 3. - pp. 469-474.
- Shields T W [et al.]** General Thoracic Surgery [Ouvrage] = Chapter 3 Ultrastructure and Morphometry of the Human Lung . - [s.l.] : Lippincott Williams & Wilkins, 2005. - Vol. 6th Edition : p. 30.
- Svartengren M [et al.]** Human lung deposition of particles suspended in air or in helium/oxygen mixture [Revue] // Exp Lung Res. - 1989. - 4 : Vol. 15. - pp. 575-585.
- Weibel E R** Morphometry of the Human Lung [Ouvrage]. - Heidelberg : Springer, 1963. - p. 111.
- Weinberger S E, Cockrill B A et Mandel J** Principles of Pulmonary Medicine [Ouvrage]. - [s.l.] : Elsevier Science, 2014. - Vol. 6eme Edition.
- Wingo P A, Tong T et Bolden S** Cancer statistics [Revue] // CA Cancer J Clin.. - 1995. - 2 : Vol. 25. - pp. 8-30.

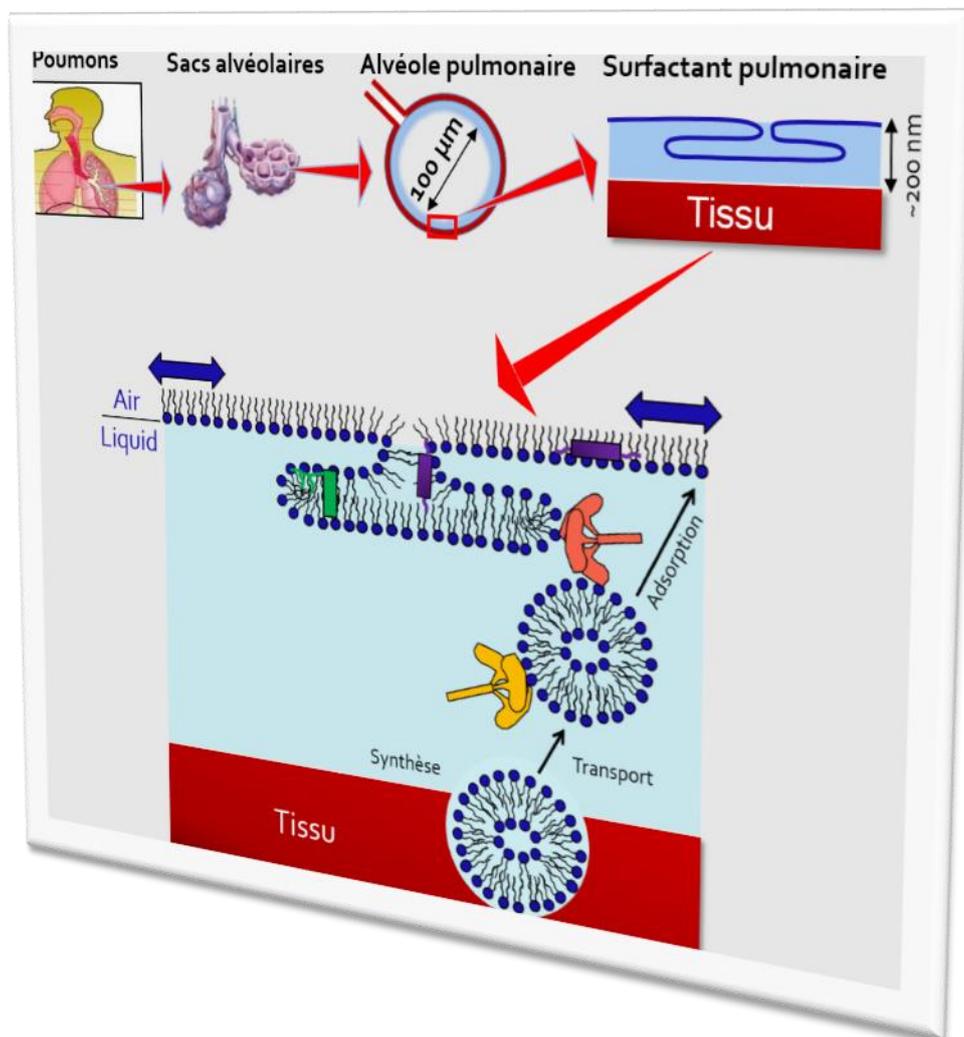
Yu C P et Chandra K Precipitation of submicron charged particles in human lung airways [Revue] // Bulletin of Mathematical Biology. - 1977. - 4 : Vol. 39. - pp. 471-478.

Yu C P Theories of electrostatic lung deposition of inhaled aerosols [Revue] // Ann Occup Hyg. . - 1985. - 2 : Vol. 29. - pp. 219-227..

Zellweger J-P L'impact des particules fines sur la santé [Conférence] // Forum ARPEA. - Lausanne : Policlinique Médicale Universitaire, 21 sept 2007.

SURFACTANT PULMONAIRE:

Modèle actuel et questions ouvertes



Chapitre C

SURFACTANT PULMONAIRE:

MODELE ACTUEL ET QUESTIONS OUVERTES

Cette thèse vise à analyser les mécanismes d'interaction des particules d'usure aéropoortées avec le surfactant pulmonaire afin d'identifier la relation entre les paramètres, les grandeurs décrivant les particules et leur effets sur le fonctionnement normal du surfactant pulmonaire, c'est-à-dire leur « toxicité ».

Dans ce contexte, ce chapitre est une synthèse bibliographique sur les principales caractéristiques du surfactant pulmonaire en termes de composition et structure, aussi que sur son rôle dans la biophysique et la mécanique respiratoire

Table des matières

C.1 Introduction.....	39
C.2 Composition et structure du surfactant pulmonaire	39
C.2.1 Les phospholipides	40
C.2.2 Les lipides neutres	45
C.2.3 Les protéines	45
C.2.3.1 Les protéines hydrophiles (SP-A et SP-D)	46
C.2.3.2 Les protéines hydrophobes (SP-B et SP-C)	47
C.3 Mécanique et biophysique du surfactant pulmonaire.....	48
C.4 Interactions avec les particules – perturbations du surfactant pulmonaire.....	51
C.5 Conclusions préliminaires	52
Travaux cités.....	54

C.1 Introduction

La première barrière biologique qu'une particule inhalée va rencontrer dans l'alvéole pulmonaire est le surfactant pulmonaire. Par rapport à la couche de mucus dans les voies aériennes, qui est beaucoup plus épaisse (2-70 μm), la couche de surfactant pulmonaire qui couvre les parois internes des alvéoles pulmonaires est très fine, ayant une épaisseur entre 140-890 nm (*Bastacky, et al., 1995*), étant constituée d'une couche lipidique ultrafine (~ 2.5 nm) qui forme localement des plis, et d'une sous-phase aqueuse. Pendant les cycles respiratoires (gonflement et dégonflement cyclique des alvéoles pulmonaires) les plis jouent le rôle de « réservoir » lipidique assurant une couverture totale de la paroi interne de l'alvéole pulmonaire. Ainsi, le surfactant pulmonaire a des fonctions complexes, car il :

- agit comme la première barrière de défense contre les polluants atmosphériques qui arrivent au niveau alvéolaire,
- exerce des rôles de protection contre les lésions et les infections (*Creuwels, et al., 1997*) (*Gehr, et al., 2000*) (*Crouch, 1998*),
- stabilise les alvéoles pulmonaires en exerçant des forces de répulsion intermoléculaires, ce qui diminue le travail des muscles inspiratoires en diminuant la compressibilité, ce qui augmente la compliance pulmonaire²⁷ (*Goerke, 1974*) (*Schurch, et al., 1976*),
- diminue la tension de surface des alvéoles pulmonaires, ce qui empêche le collapsus alvéolaire²⁸ à la fin de l'expiration (la diminution plus importante de la tension superficielle dans les alvéoles de petite taille limite leur tendance à se vider dans les plus grosses) (*Hills, 1990*).

C.2 Composition et structure du surfactant pulmonaire

Dans les années 30, Von Neergaard a été le premier à élucider les forces répulsives intrapulmonaires qui maintiennent les poumons ouverts pendant la respiration. Selon ses études, sur des poumons excisés, la pression nécessaire pour maintenir le poumon gonflé avec de l'air est supérieure à la pression nécessaire pour maintenir le poumon gonflé avec une solution isotonique²⁹, concluant que la différence de pression entre ces deux cas provient des forces de tension superficielle à l'interface air-liquide (Fig. 1) car l'insufflation avec la solution isotonique supprime l'interface liquide-air et augmente la distensibilité (compliance).

²⁷ La compliance pulmonaire (de l'anglais compliance) est la capacité du poumon à modifier son volume en réponse à une variation de pression. en effet, la compliance est d'autant plus haute que la pression nécessaire pour amener le poumon à un volume donné est modérée

²⁸ L'effondrement de l'alvéole pulmonaire. L'effondrement peut être dû à des blocages qui se produisent dans les voies aériennes supérieures ou inférieures (trachée, bronches, ou bronchioles) ou à l'absence ou l'inactivation du surfactant pulmonaire.

²⁹ Une solution isotonique par rapport au milieu intracellulaire contient une quantité de solutés dissous égale à celle du cytoplasme. Chez les humains et la plupart des autres mammifères, une solution isotonique correspond à 0,9 % en poids (ou 9 g/L) de chlorure de sodium en solution aqueuse. Cette solution est appelée solution ou sérum physiologique.

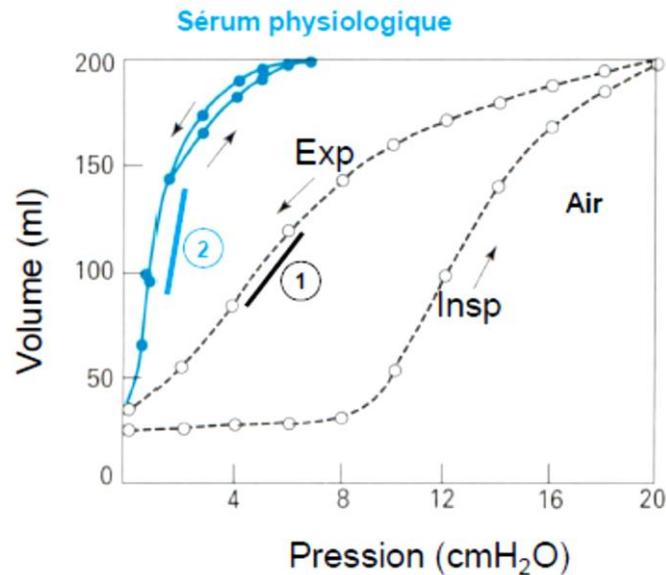


Fig.1 Mise en évidence du rôle de la tension superficielle sur un poumon isolé de chat. On peut observer que la compliance avec air est inférieure à la compliance avec du sérum physiologique. D'après (Levitzky, 2003)

Cela a été une découverte majeure, mais pas complètement comprise à cette époque. Plus tard, Pattle (*Pattle, 1958*), en analysant les substances provenant du lavage pulmonaire³⁰ a trouvé des substances insolubles dans l'eau qui peuvent réduire la tension de surface jusqu'à 0 mN/m. En effet, c'est un résultat vraiment surprenant mais absurde du point de vue thermodynamique, car, n'importe quelle interface disparaît à une tension de surface 0 mN/m. Ultérieurement, Brown (*Brown, 1964*) montre la présence des phospholipides, comme composant majoritaire du surfactant pulmonaire, puis d'autres études (*King, et al., 1972*) (*Possmayer, 1988*) (*Takahashi, et al., 1986*) mettent en évidence aussi la présence des protéines dans le surfactant pulmonaire. Depuis, plusieurs études ont analysé la composition du surfactant pulmonaire à partir des lavages pulmonaires et par conséquent, actuellement la composition du surfactant est largement connue, le surfactant pulmonaire étant composé principalement des lipides (~90%, dont la plupart des phospholipides) et des protéines (~10%).

C.2.1 Les phospholipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles, dont la structure se compose de deux parties (Fig. 2) :

- une « tête » hydrophile composée de trois éléments qui sont un glycérol, un phosphate et un groupe alcool spécifique à chaque type de phospholipide. Ce groupe peut être chargé ou neutre,
- deux queues hydrophobes composées de deux chaînes d'acides gras.

³⁰ Le lavage pulmonaire ou lavage broncho-alvéolaire est une méthode développée par Finley et Reynolds consistant à injecter dans les bronches et les alvéoles pulmonaires une solution (50 à 250 ml) de liquide physiologique stérile à 37 °C, ou un agent mucolytique. On récupère ensuite ce liquide ce qui permet d'effectuer certains examens biochimiques pour en déterminer la composition ou pour la recherche d'infections ou autres pathologies.

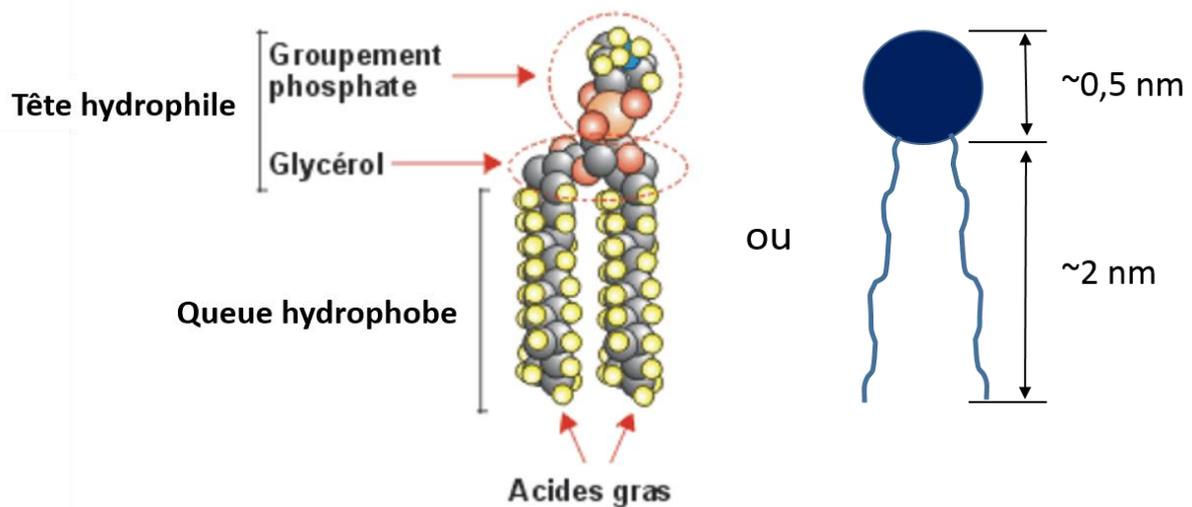


Fig.2 Structure et schéma d'une molécule phospholipidique. Modifié du (LEFUR, et al., 2004)

Plusieurs types de phospholipides peuvent exister selon le type d'alcool présent dans le groupement hydrophile, parmi lesquels les phosphatidylcholines (PC), les phosphatidylethanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS), les phosphatidylinositols (PI), chacun remplissant des fonctions différentes.

Les queues hydrophobes de la majorité des phospholipides sont constituées de molécules d'acides gras à longue chaîne carbonée. En fonction du nombre d'atomes de carbone et du nombre de doubles liaisons qui les composent, les phospholipides peuvent influencer leur phase³¹ : solide (gel) ou fluide (liquide).

En milieu aqueux, en fonction des paramètres d'empilement³², les phospholipides ont tendance à adopter plusieurs types de structures (polymorphisme), qui leur confère des possibilités d'auto-organisation et de former spontanément des structures différentes : monocouches et bicouches lipidiques, micelles ou vésicules lipidiques

³¹ Les phospholipides avec des queues de plus de 14 atomes de carbone sont solides à température ambiante, tandis que celles de moins de 14 sont fluides. Ce phénomène est analogue au fait que la cire de paraffine, qui est constituée de longs alcanes, est solide à la température ambiante, tandis que l'octane (l'essence), un court alcane est liquide à la température ambiante.

³² En première approximation, les molécules de tensioactif ont une forme tronconique. La surface moyenne définie par le volume effectif occupé par les queues hydrophobes v sur la longueur moyenne des chaînes l est en règle générale différente de la surface a occupée par les têtes polaires. On définit un paramètre d'empilement $p = v/a \cdot l$. Plus la valeur de p est élevée, moins la surface doit être courbée pour accommoder le volume des queues hydrophobes, ce qui détermine la microstructure des autoassemblages en régime dilué.

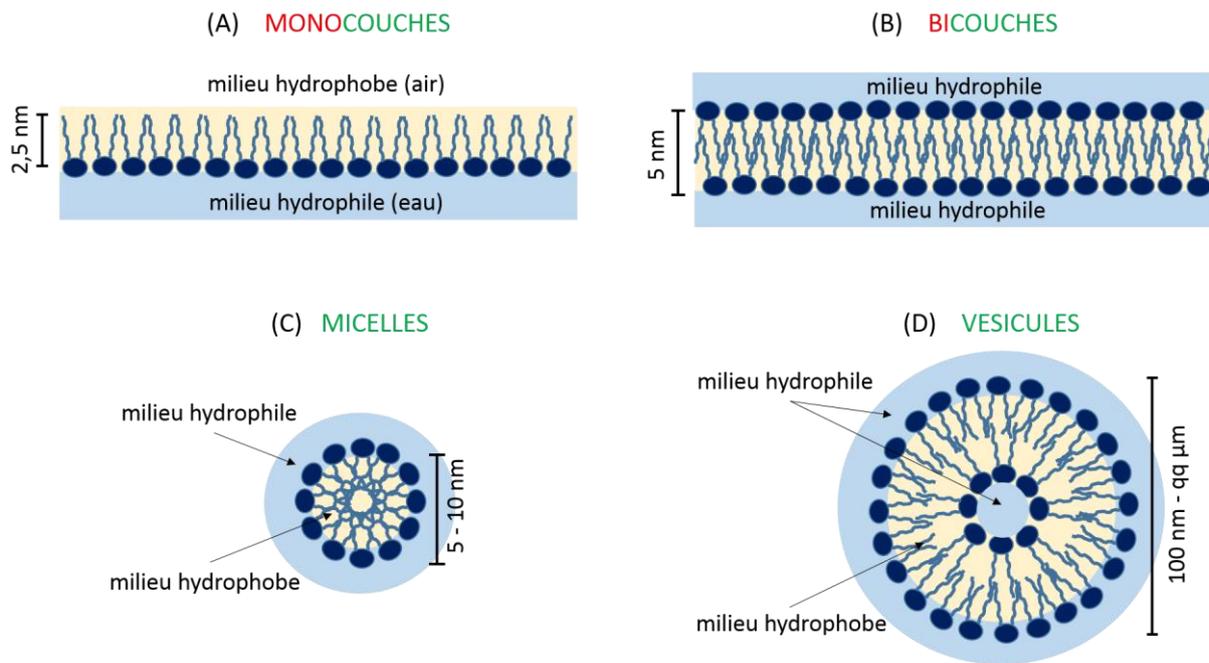


Fig. 3 Auto-organisation des phospholipides en milieu aqueux

Les phospholipides du surfactant pulmonaire sont synthétisés dans la sous-phase aqueuse, sous forme de vésicules, par les cellules du tissu pulmonaire (pneumocytes de types 2). Puis, par différents mécanismes, ces composants sont adsorbés à l'interface air-liquide où ils forment des monocouches lipidiques. Ces monocouches lipidiques viennent en contact par l'intermédiaire de leurs queues hydrophobes avec l'air intra-alvéolaire et avec la sous-phase aqueuse par l'intermédiaire de leur tête hydrophile. A cause des mouvements de compression latérale pendant l'expiration, la monocouche forme des plis dans la sous-phase ce qui donne l'aspect d'une structure multilamellaire, (Fig. 4 et Fig. 5) qui a été déjà mise en évidence par des techniques de microscopie électronique (*Schürch, et al., 1998*) (*Schürch, et al., 1995*) (*Pérez-Gil, 2008*).

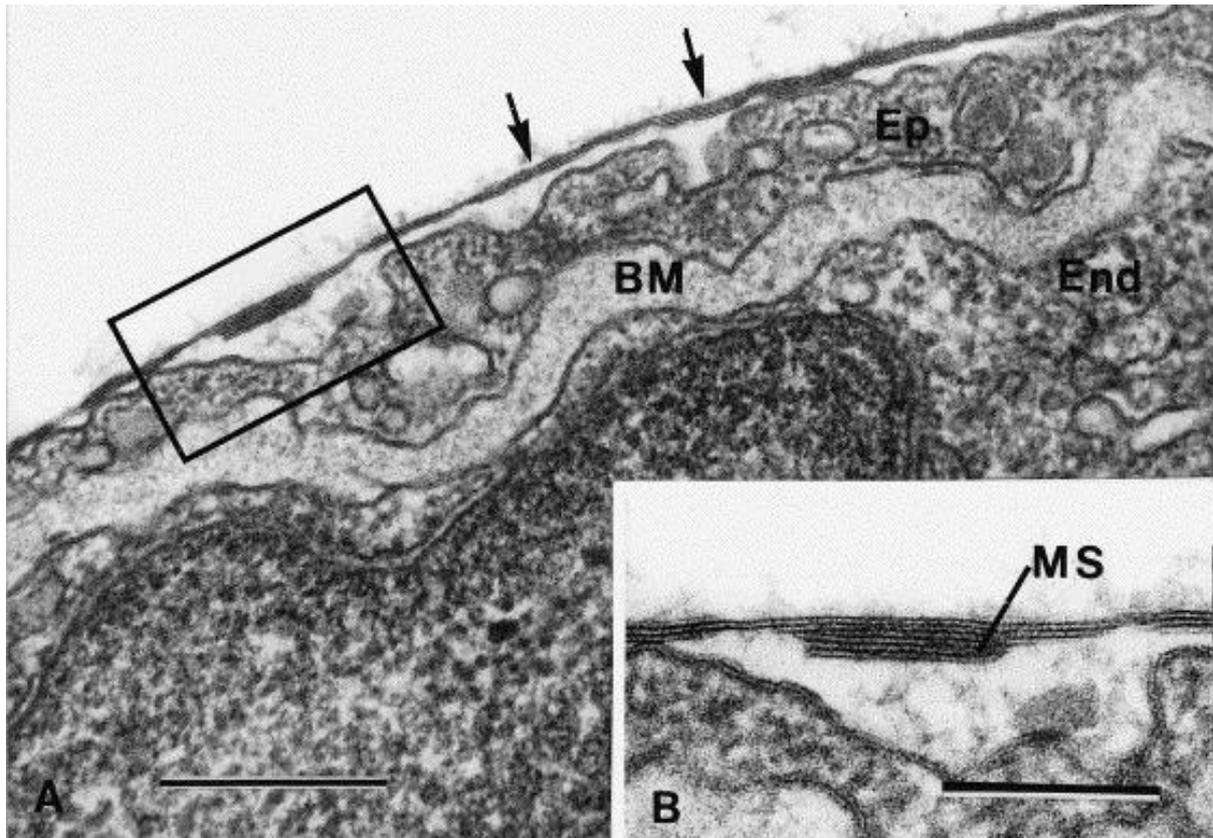


Fig. 4 A. Surface de l'alvéole pulmonaire d'un porc de Guinée qui met en évidence la présence du surfactant pulmonaire sous forme des structures multilamelaires. B. Zoom montrant la variation des lamelles de 2 à 7.

MS = structure multilamellaire, BM = membrane basale³³, Ep = épithélium alvéolaire, End = endothélium vasculaire³⁴. Les flèches indiquent la couche de surfactant pulmonaire. Image reprise de (Schürch, et al., 1998)

³³ La membrane basale est une structure particulière qu'on trouve à l'interface entre un épithélium ou un endothélium et un autre tissu. Sa perméabilité régule les échanges de molécules, en particulier de nutriments, entre les deux tissus. Elle contribue également à la cohésion structurale de l'épithélium

³⁴ L'endothélium vasculaire est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, celle en contact avec le sang

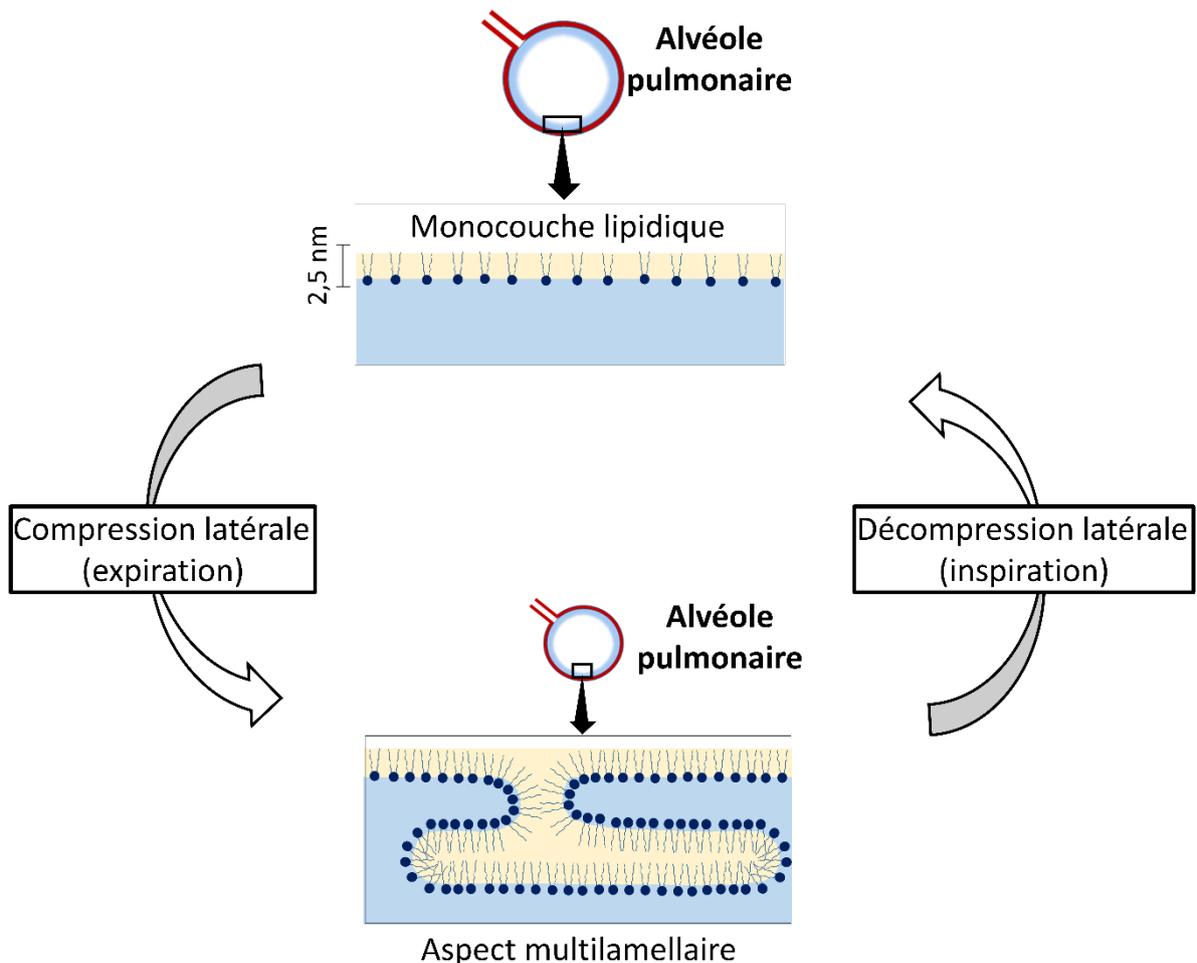


Fig. 5 Schémas des structures lipidiques du surfactant pulmonaire pendant les cycles respiratoires

La composition en phospholipides du surfactant pulmonaire des différentes espèces a été élucidé par Veldhuizen (*Veldhuizen, et al., 1998*). Ainsi, chez l'homme, les phosphatidylcholines (PC) représentent environ 80% du total des phospholipides, dont plus de la moitié est di-saturée, donc en phase gel (DPPC - dipalmitoylphosphatidylcholine³⁵). Cependant, le DPPC est considéré comme étant le principal responsable de la faible tension de surface du surfactant pulmonaire (*Watkins, 1968*) et il forme des structures sous forme des monocouches lipidiques. Néanmoins, quand il est utilisé seul, il n'est pas très efficace, car il forme des structures rigides, en s'adsorbant et s'étalant lentement à l'interface air-liquide. Par contre, les phospholipides en phase fluide ou les phospholipides chargés sont de bons fluidifiants qui favorisent l'adsorption et l'étalement (*Harishchandra, et al., 2010*). Ainsi, le reste du PC dans le surfactant pulmonaire est en phase fluide et les phospholipides négatifs comme par exemple le PS, PI et PG représentent environ 15 %. Mais, il faut mentionner que les « fluidifiants » limitent la tension de surface minimale du surfactant pulmonaire pouvant être obtenue au cours de sa compression latérale (expiration). Pour cela, pendant la compression, les « fluidifiants » sont éjectés de manière sélective dans la sous-phase aqueuse, par la formation des plis ce qui se traduit par une augmentation de la concentration du DPPC dans la monocouche du surfactant pulmonaire (*Watkins, 1968*) (*Pastrana-Rios, et al., 1994*) et

³⁵ Le DPPC est constitué d'une tête PC et des deux queues contenant 16 atomes de C, sans doubles liaisons

par conséquent des tensions de surface très faibles qui maintiennent l'alvéole ouverte et favorisent la respiration.

Le surfactant pulmonaire contient aussi environ 5% de PE et d'autres phospholipides (Akella, et al., 2013), dont le rôle n'est pas complètement connu.

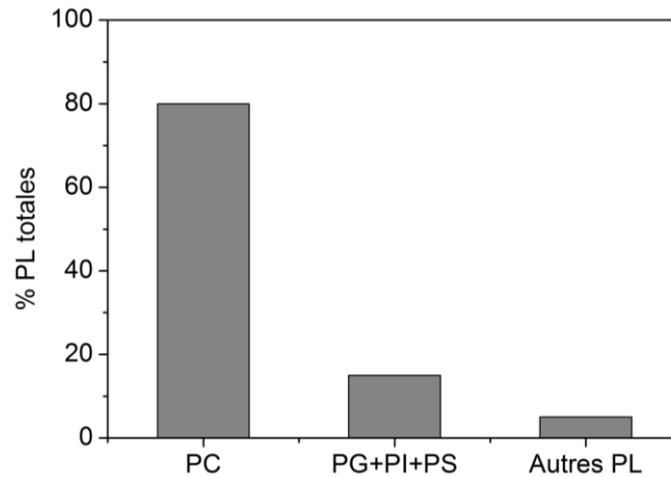


Fig.6 Composition des phospholipides (PL) du surfactant pulmonaire humain. D'après (Veldhuizen, et al., 1998) (Akella, et al., 2013) (Pérez-Gil, 2008)

C.2.2 Les lipides neutres

Le surfactant pulmonaire contient aussi des quantités non-négligeables de lipides neutres (comme par exemple le cholestérol³⁶) et de l'acide palmitique mais leur rôle est loin d'être connu. Le cholestérol augmente probablement la fluidité des monocouches lipidiques en favorisant la formation des plis (Veldhuizen, et al., 2000).

C.2.3 Les protéines

Les protéines présentes dans la structure du surfactant pulmonaire sont les SP-A (surfactant protein A), SP-B, SP-C et SP-D. Ces protéines peuvent être divisées en deux groupes, SP-B et SP-C sont des protéines hydrophobes de petite taille, tandis que SP-A et SP-D sont des protéines hydrophiles de taille plus grande. Par la suite, la structure et les fonctions de ces protéines seront présentées. Toutefois, comme la protéine hydrophile SP-D n'est pas impliquée dans l'activité de surface du surfactant pulmonaire, ayant plutôt des fonctions métaboliques, elle sera présentée brièvement. Pour plus d'informations, d'excellentes revues sont disponibles dans la littérature (Crouch, 1998) (Reid, 1998) (Haagsman, 1998). Par conséquent, on va se concentrer sur les protéines SP-A, SP-B et SP-C, dont le rôle est essentiel dans la structuration et le bon fonctionnement du surfactant pulmonaire en interagissant de manière spécifique avec les structures lipidiques comme on le verra par la suite.

³⁶ Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui joue un rôle central dans de nombreux processus biochimiques. Il se trouve dans la structure des membranes lipidiques contribuant à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides (formant la membrane).

C.2.3.1 Les protéines hydrophiles (SP-A et SP-D)

SP-A a été la première protéine découverte dans le surfactant pulmonaire. Les anciennes études *in vitro* ont attribué à cette protéine des fonctions homéostatiques incluant un rôle dans :

- le transport des lipides vers l'interface air-liquide contribuant à la formation de la myéline tubulaire³⁷ (Suzuki, *et al.*, 1989),
- la protection du surfactant pulmonaire contre l'inhibition par les protéines sériques³⁸ (Strayer, *et al.*, 1996),
- la régulation de la sécrétion du surfactant pulmonaire par les pneumocytes de type II (Horowitz, *et al.*, 1997).

Les études plus récentes attribuent aussi à cette protéine des rôles dans les mécanismes immunologiques de défense (Tino, *et al.*, 1998). En ce concerne la structure, elle est constituée par six trimères qui sont disposés sous forme de fleur (Fig.7) (Veldhuizen, *et al.*, 2000). A cause de son hydrophile, elle va interagir plutôt avec les têtes lipidiques.

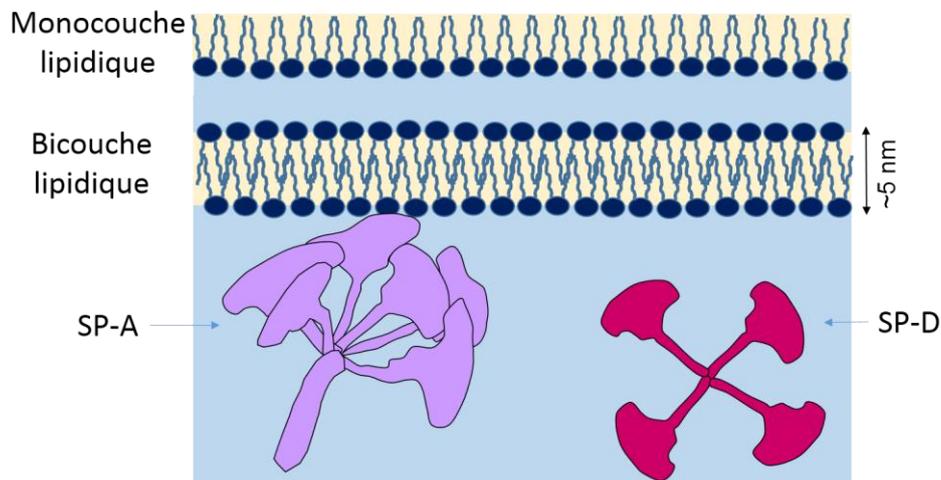


Fig. 7 Structure schématique des protéines SP-A et SP-D et leur interaction avec les structures lipidiques. D'après (Pérez-Gil, 2008)

SP-D est une autre protéine hydrophile du surfactant pulmonaire, mais qui a des rôles exclusivement dans les mécanismes immunologiques de défense, contenant dans sa structure des régions de reconnaissance des virus et des bactéries favorisant ainsi leur phagocytose par les macrophages (Wright, 2004).

³⁷ Après sa sécrétion par des pneumocytes de type II, le surfactant pulmonaire est libéré dans l'alvéole sous forme d'un réseau appelé myéline tubulaire, une structure complexe formée par les protéines et les lipides. Cela ne sera pas présenté dans cette thèse car elle n'est pas impliquée dans l'activité de surface du surfactant pulmonaire, ayant plutôt des fonctions de transport.

³⁸ Les protéines sériques sont des protéines contenues dans le sérum ou plasma sanguin, la partie liquide du sang. Elles exercent différentes fonctions, de transport, de défense de l'organisme, de régulation des échanges d'eau entre le sang et le milieu extérieur. Parmi les protéines sériques, on distingue essentiellement l'albumine et les globulines de différents types

C.2.3.2 Les protéines hydrophobes (SP-B et SP-C)

Parmi les quatre protéines du surfactant pulmonaire, le **SP-B** est la seule protéine qui est indispensable à la respiration, mais malgré ça, sa structure tridimensionnelle exacte n'est pas encore connue. Plusieurs études expérimentales ont été menées dans ce but (*Andersson, et al.*) (*Pastrana-Rios, et al., 1995*) donnant une bonne vue d'ensemble sur la conformation et la disposition dans le surfactant pulmonaire. Ainsi, SP-B est une protéine hydrophobe constituée de 79 aminoacides³⁹ ayant un poids moléculaire⁴⁰ d'environ 9kDa. Elle se trouve sous forme de dimères et trimères (respectivement deux et trois unités répétitives). La figure 8 représente de manière schématique un monomère (une seule unité) de SP-B. A cause de son hydrophobie, elle va interagir plutôt avec les queues lipidiques, comme il a été montré en utilisant la résonance paramagnétique électronique⁴¹ (*Serrano, et al., 2006*) et comme il est schématisé sur la figure 8. Egalement, le SP-B a une partie chargée positivement qui est susceptible d'interagir de manière électrostatique avec les lipides chargés négativement (PS, PI, PG) (*Veldhuizen, et al., 2000*). L'un des plus importants rôles du SP-B est donc la stabilisation des structures lipidiques à l'interface eau-liquide. Ainsi, aussi bien dans les monocouches lipidiques que dans les bicouches lipidiques (plis), le SP-B est placé avec son axe presque parallèle à l'interface en interagissant simultanément avec les queues hydrophobes et avec les têtes des phospholipides chargés négativement. Ce placement consolide les structures lipidiques et en même temps améliore leurs propriétés mécaniques lors des mouvements cycliques de compression-expansion pendant les cycles respiratoires. **SP-C**, un autre protéine hydrophobe du surfactant pulmonaire est constituée de 35 aminoacides et possède un poids moléculaire entre 3 et 5 kDa. La structure tridimensionnelle a été déterminée par *Johansson et al.* en utilisant la résonance magnétique nucléaire (*Johansson, et al., 1994*). Comme il est montré sur la figure 8, SP-C est constituée d'un segment principal appelé le corps de la protéine, très hydrophobe contenant 22-25 aminoacides et une queue très mobile contenant 10-12 aminoacides.

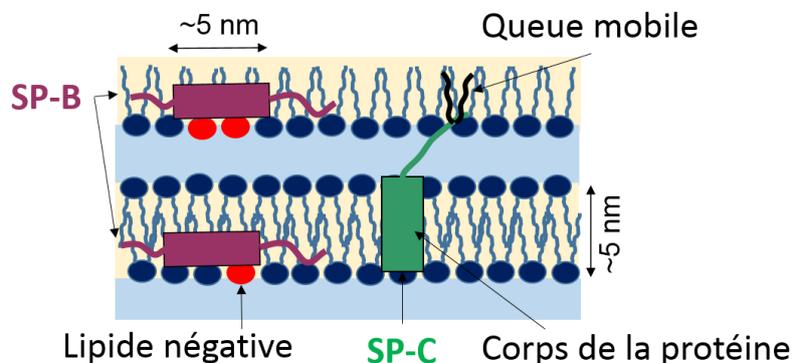


Fig. 8 Structure schématique des protéines SP-B et SP-C et leur interaction avec les structures lipidiques. D'après (Pérez-Gil, 2008)

³⁹ Les aminoacides (ou acides aminés) sont une classe de composés chimiques possédant deux groupes fonctionnels : à la fois un groupe carboxyle $-COOH$ et un groupe amine $-NH_2$. Ils polymérisent en formant des liaisons peptidiques (le groupe amine est lié au groupe carboxyle) qui aboutissent à de longues chaînes macromoléculaires appelées protéines.

⁴⁰ La masse moléculaire est le rapport entre la masse d'une molécule et l'unité de masse des atomes. En biochimie on appelle également l'unité de masse des atomes le dalton (symbole Da), en l'honneur de John Dalton pour son travail sur la théorie atomique. Un dalton est défini comme égal à $1/12$ de la masse d'un atome de carbone 12.

⁴¹ Technique basée sur la propriété de certains électrons à absorber, puis réémettre l'énergie d'un rayonnement électromagnétique lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Celle-ci permet de mettre en évidence la structure d'une molécule.

Le modèle proposé par Serrano et al. suppose que le PS-C, par l'intermédiaire de la queue mobile, favorise et consolide les plis formés à la fin de l'expiration (Serrano, et al., 2006). Puis, des études ultérieures sur des structures lipidiques sous compression latérale, contenant du SP-C (Kramer, et al., 2000) ont validé ce modèle.

C.3 Mécanique et biophysique du surfactant pulmonaire

La plus importante caractéristique du comportement surfacique du surfactant pulmonaire est la pression de surface. La pression de surface, notée π , est défini comme la différence entre la tension de surface de la sous-phase aqueuse γ_0 et la tension de surface de la sous-phase couverte par la couche de surfactant pulmonaire γ .

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

En effet, la tension de surface est la force (exprimée en mN/m)⁴² qui se manifeste à la surface d'un liquide parce que les interactions entre les molécules de liquide sont beaucoup plus importantes que les interactions entre le liquide et le gaz. La conséquence est que la surface de liquide tend à être la plus petite possible⁴³. Par conséquent, la pression de surface définie par l'équation (1) représente une pression d'expansion exercée par le surfactant pulmonaire qui agit contre la tension de surface (de contraction) de la sous-phase (Fig.9). En effet, la pression de surface est l'équivalent bidimensionnel de la pression en 3 dimensions.

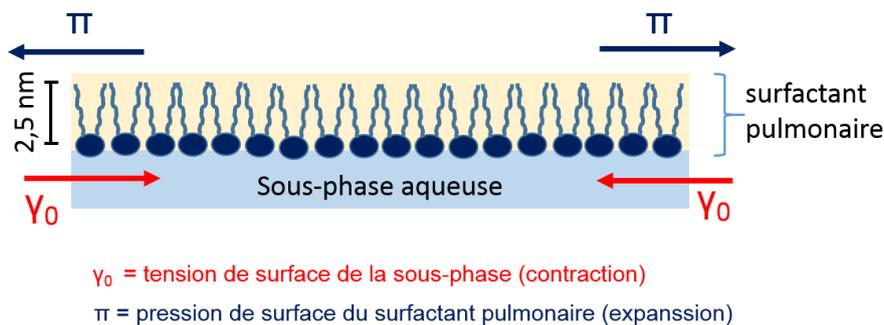


Fig. 9 Pression de surface du surfactant pulmonaire. Elle provient des forces de répulsion latérale entre les molécules lipidiques constituantes et s'opposent à la force de tension de surface de la sous-phase

Par exemple, si on s'imagine une alvéole pulmonaire sans la couche de surfactant (Fig. 10a), les forces de tension de surface de la sous-phase, auront tendance à diminuer la taille de l'alvéole pulmonaire et par conséquent à augmenter le travail des muscles respiratoires nécessaire pour gonfler les alvéoles pulmonaires lors de l'inspiration. Cela se traduit par la diminution de la capacité respiratoire. En réalité, le surfactant pulmonaire crée des forces de répulsion latérale entre les molécules lipidiques constituantes (Fig. 10b), qui s'opposent à la force de tension de surface de la sous-phase, la résultante étant la pression de surface π . On peut ainsi définir la compressibilité du surfactant pulmonaire comme étant le rapport entre la déformation relative du surfactant pulmonaire et la variation de la pression de surface lors de la compression. Pour un surfactant pulmonaire efficace, une faible compressibilité est souhaitée.

⁴² La mesure de la force d'attraction des molécules de surface par unité de longueur du matériau

⁴³ Par exemple, dans le cas d'une bulle de savon, avec deux interfaces liquide-air, cette diminution de la surface est responsable de la formation d'une sphère (surface la plus petite possible pour un volume donné).

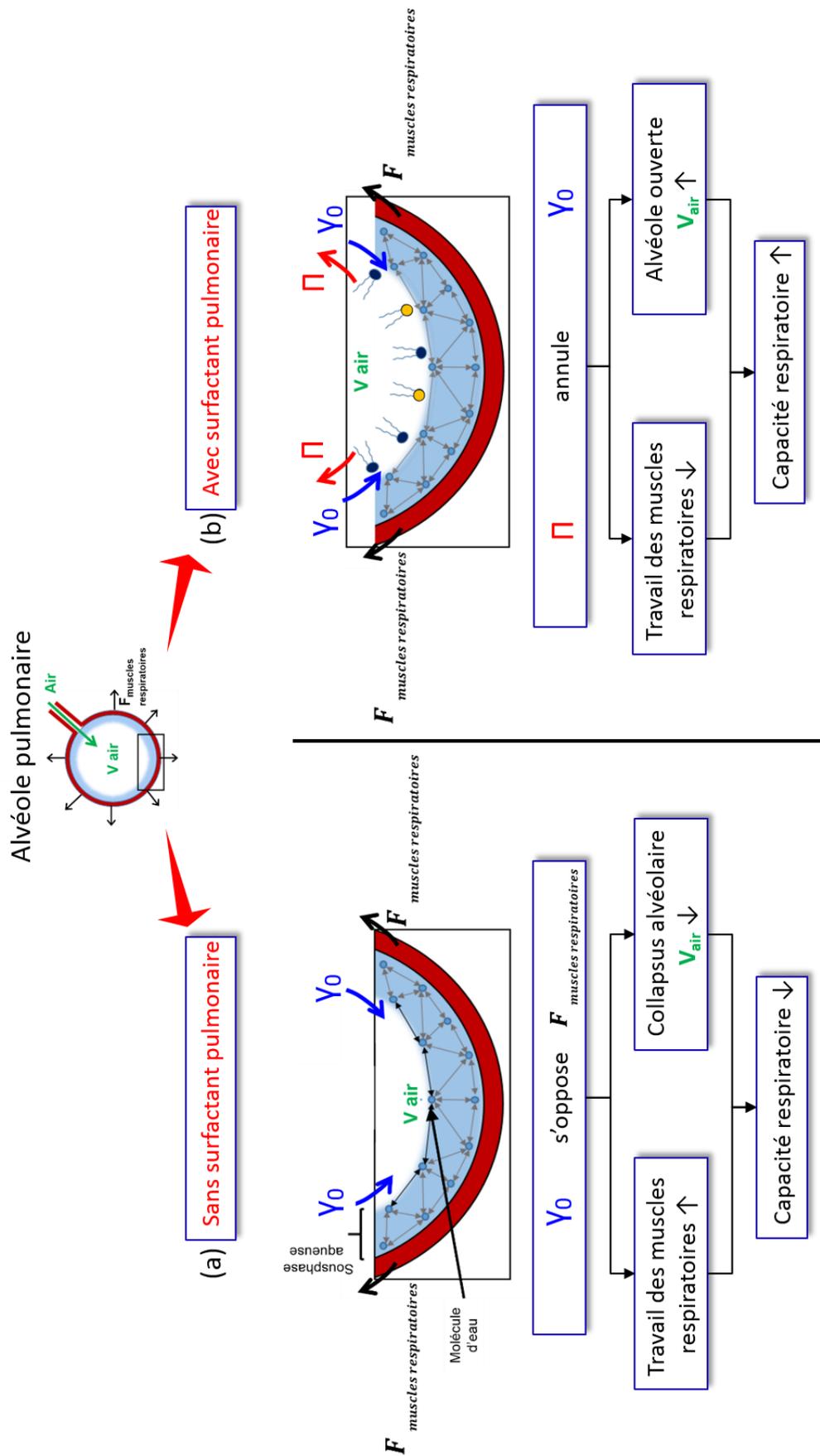


Fig. 10 Effet du surfactant pulmonaire sur la capacité respiratoire. Les molécules d'eau de la sous-phase sont beaucoup plus fortement attirées par des autres molécules d'eau que par des molécules de l'air. Cette attraction crée une tension de surface γ_0 qui fait que les molécules d'eau en contact avec l'air se rapprochent les unes des autres. Par conséquent la surface en contact avec l'air a tendance à diminuer ce qui augmente le travail des muscles respiratoires et diminue la capacité respiratoire (a). En revanche, les lipides du surfactant pulmonaire s'interposent entre les molécules d'eau à l'interface avec l'air et créent une pression de surface Π qui diminue la tension de surface de la sous-phase. Cela se traduit par une diminution du travail des muscles respiratoires et augmentation la capacité respiratoire (b).

Un autre effet de la diminution de la compressibilité est la stabilisation des alvéoles pulmonaires, c'est à dire de permettre la coexistence d'alvéoles de tailles différentes. Pour mieux expliquer cet effet, les alvéoles pulmonaires seront assimilées à des sphères interconnectées (Fig.11).

Comme mentionné, les forces de tension de surface dans la sphère (alvéole) ont tendance à augmenter la compressibilité, donc à diminuer leur taille et par conséquent à augmenter la pression à l'intérieur de la sphère. Selon la loi de Laplace, pour une sphère, la relation entre la tension de surface et la pression à l'intérieur de la sphère est :

$$P = \frac{2 * \gamma}{r} \quad (2)$$

où γ est la tension de surface et r est le rayon interne de la sphère (alvéole pulmonaire).

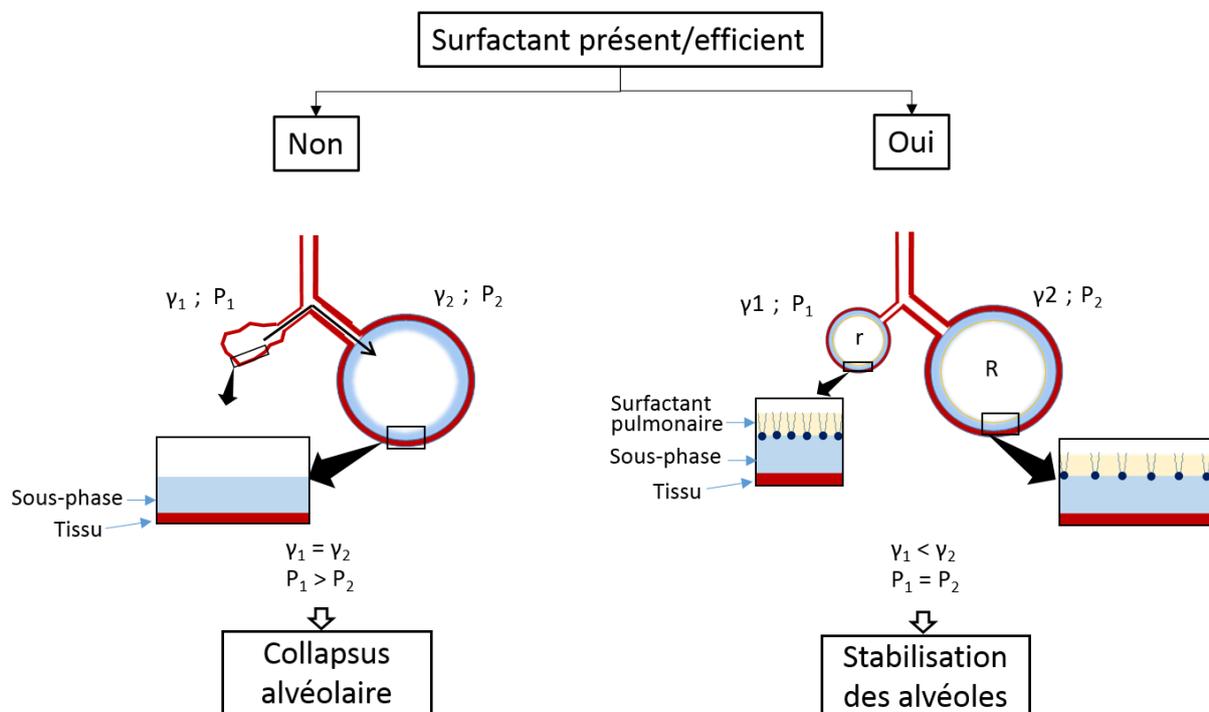


Fig. 11 Représentation schématique des conséquences de l'absence du surfactant pulmonaire sur la stabilisation des alvéoles pulmonaires de différente taille.

Ainsi, dans des petites alvéoles, la tension de surface génère des pressions plus grandes par rapport aux grandes alvéoles. Par conséquent, l'air est transféré des petites alvéoles vers les plus grandes, ce qui conduit au collapsus des petites alvéoles. En revanche, le surfactant pulmonaire diminue la compressibilité dans les alvéoles, et cette diminution est plus importante dans les petites alvéoles que dans les grandes alvéoles. Le résultat est l'équilibrage des pressions et donc la stabilisation des alvéoles pulmonaires.

Il est évident, donc qu'un point clé dans la compréhension des processus respiratoires et de ses éventuelles perturbations est de comprendre la compressibilité du surfactant pulmonaire. D'un point de vue mécanique, pour le surfactant pulmonaire, la compressibilité (module de compressibilité) peut être définie comme étant la variation relative de l'aire sous l'effet de la

pression latérale appliquée (Behroozi, 1996). *In vivo* le surfactant pulmonaire est soumis à des variations cycliques d'environ 30-40 % de son aire initiale, à une fréquence entre 0.04-0.2 Hz autour d'une pression de surface d'environ 35 mN/m (Guzmán, et al., 2011). On peut définir ainsi la compressibilité comme étant la variation de la pression de surface avec l'aire. On remarquera que le coefficient de compressibilité est l'inverse du module d'élasticité. En effet, analogue au cas des corps 3D élastiques, l'élasticité du surfactant pulmonaire représente sa résistance à la compression (Lyklema, 2000) dans notre cas à la diminution du volume de l'alvéole pulmonaire. Ainsi, **un surfactant pulmonaire efficace doit avoir une faible compressibilité, donc un module d'élasticité élevé**. Par conséquent, les perturbations du surfactant pulmonaire, liées à la toxicité des certaines particules aéroportées, peuvent être associées à des changements des propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire, plus précisément à des changements d'élasticité. Donc, la toxicité des particules d'usure peut être ramenée à un problème d'élasticité du surfactant pulmonaire.

C.4 Interactions avec les particules – perturbations du surfactant pulmonaire

Schruch et al. ont montré que lors du premier contact avec le surfactant pulmonaire, une particule inhalée est immédiatement déplacée dans la sous-phase aqueuse à cause des forces de mouillabilité et de la pression de surface élevée (Schürch, et al., 1990). Ainsi, de manière synthétique, la force F qui agit sur une particule qui vient en contact avec le surfactant pulmonaire (Fig. 12) est constituée par la somme de trois forces différentes (Rapacchietta, et al., 1976) :

- la force donnée par la tension de surface du surfactant pulmonaire F_γ ,

$$F_\gamma = 2 * \pi * R * \gamma_{monocouche} * \sin\Phi * \sin(\Phi + \theta) \quad (3)$$

où R représente le rayon de la particule, $\gamma_{monocouche}$ représente la tension de surface, Φ est l'angle entre la verticale et le bord du ménisque qui donne l'état de pénétration de la particule dans la sous-phase aqueuse et θ est l'angle de contact entre le liquide et la particule.

- la force de gravité G de la particule,

$$G = \frac{4}{3} * \pi * R^3 * \rho_{particule} * g \quad (4)$$

où $\rho_{particule}$ est la densité de la particule et g représente l'accélération gravitationnelle.

- la force d'Archimède B

$$\begin{aligned} B = & \pi * R^2 * (\rho_{liquide} - \rho_{air}) * g * z * \sin^2\Phi + \\ & + \pi * R^3 (\rho_{liquide} - \rho_{air}) * g * \sin^2\Phi * \cos\theta + \\ & + \frac{2}{3} * \pi * R^3 * (\rho_{liquide} - \rho_{air}) * g * (\cos^3\theta - 1) \end{aligned} \quad (5)$$

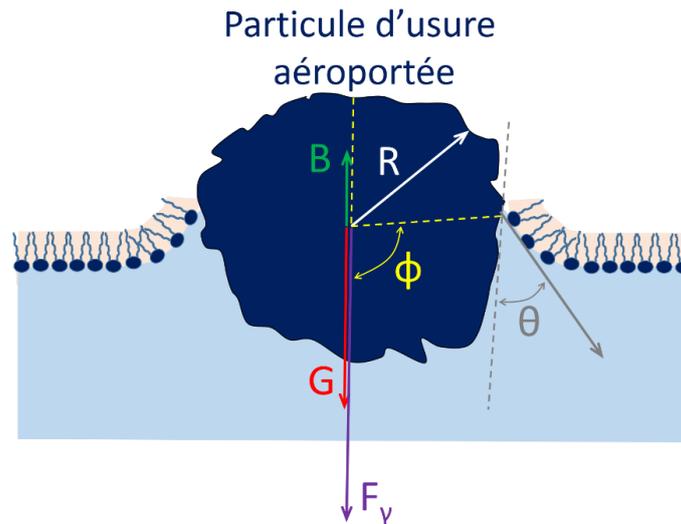


Fig. 12 Equilibre des forces qui agissent sur une particule après contact avec le surfactant pulmonaire. D'après (Rapacchietta, et al., 1976)

Ainsi, la résultante des forces qui agit sur la particule est :

$$F = F_{\gamma} + G - B \quad (6)$$

Comme les forces B et G sont négligeables à cause de la faible taille de la particule, la force prédominante qui va déplacer la particule vers la sous-phase est la force F_{γ} (la force donnée par la tension de surface du surfactant pulmonaire). Après le déplacement dans la sous-phase, en plus des réactions inflammatoires, qui ne font pas l'objet de cette thèse, la particule peut interagir avec le surfactant pulmonaire et générer des changements dans la microstructure et la mécanique du surfactant pulmonaire. Ces changements sont dépendants à la fois des propriétés de surface de la particule (charge de surface, composition chimique, rugosité etc.) et à la fois des paramètres concernant le surfactant pulmonaire (changement de conformation de molécules, interactions électrostatiques etc.).

C.5 Conclusions préliminaires

Le but de ce chapitre a été de présenter une synthèse bibliographique des principales caractéristiques du surfactant pulmonaire, en s'appuyant sur la composition, la structure et le rôle du surfactant pulmonaire dans la biophysique et la mécanique respiratoire. La figure 13 présente le modèle de surfactant pulmonaire, un mélange complexe de phospholipides et de protéines. Les phospholipides incluent principalement le PC, mais aussi des phospholipides négatifs comme le PG, PS et PI avec un rôle de fluidifiant. Ces molécules possèdent deux queues hydrophobes dirigées vers le gaz alvéolaire et une tête hydrophile dirigée vers la sous-phase. Les protéines incluent des glycoprotéines (SP-A et SP-D) et de petites protéines hydrophobes (SP-B et SP-C). Les phospholipides et les protéines participent aux propriétés tensioactives du surfactant pulmonaire en diminuant la tension de surface de l'interface air-liquide. Les avantages de cette diminution de la tension de surface sont :

- la diminution de la compressibilité (augmentation du module d'élasticité) du surfactant pulmonaire ce qui diminue le travail des muscles respiratoires,

- la stabilisation des alvéoles (la diminution plus importante de la tension superficielle dans les alvéoles de petite taille limite leur tendance à se vider dans les plus grosses).

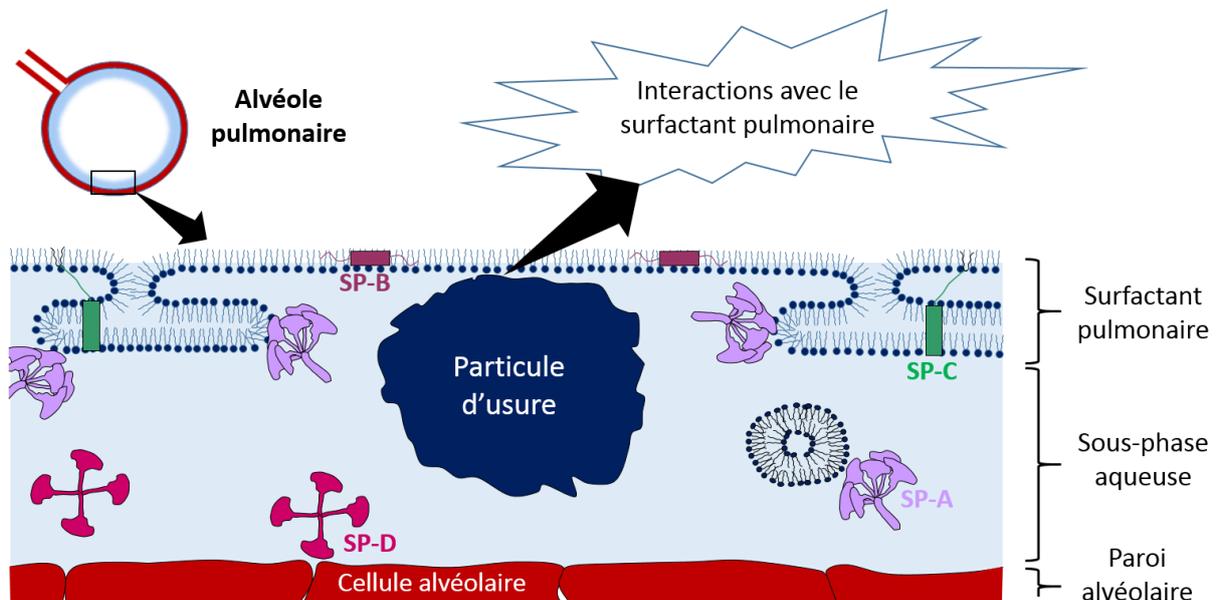


Fig. 13 Représentation schématique de l'interaction d'une particule d'usure aéroportée dans la sous-phase avec le surfactant pulmonaire. Synthèse de (Pérez-Gil, 2008) (Pérez-Gil, 1998), (Ruge, 2012)

Les perturbations du fonctionnement normal du surfactant pulmonaire peuvent provoquer des maladies graves. Les particules d'usure aéroportées qui arrivent au niveau alvéolaires sont susceptibles de perturber ce fonctionnement car elles seront déposés dans la sous-phase et interagiront avec le surfactant pulmonaire comme il est montré sur la figure 13 qui présente de manière schématique une particule aéroportée arrivée au niveau alvéolaire dans la sous-phase du surfactant pulmonaire.

Travaux cités

- Akella A and Deshpande S** Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders [Journal] // Indian Journal of Experimental Biology. - 2013. - Vol. 51. - pp. 5-22.
- Andersson M [et al.]** An amphipathic helical motif common to tumourolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B. [Journal] // FEBS Lett. - Vol. 362. - pp. 328-332.
- Bastacky J [et al.]** Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung [Journal] // J Appl Physiol. - 1995. - 5 : Vol. 79. - pp. 1615-1628.
- Behroozi F** Theory of Elasticity in Two Dimensions and Its Application to Langmuir–Blodgett Films [Journal] // Langmuir. - 1996. - 9 : Vol. 12. - pp. 2289–2291.
- Brown E** ISOLATION AND ASSAY OF DIPALMITYL LECITHIN IN LUNG EXTRACTS [Journal] // Am J Physiol.. - 1964. - Vol. 207. - pp. 402-407.
- Creuwels L A, van Golde L M and Haagsman H P** The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects [Journal] // Lung. - 1997. - 1 : Vol. 175. - pp. 1-39.
- Crouch E C** Collectins and pulmonary host defense [Journal] // Am J Respir Cell Mol Biol.. - 1998. - 2 : Vol. 19. - pp. 177-201.
- Crouch E C** Structure, biologic properties, and expression of SP-D [Journal] // Biochim. Biophys. Acta. - 1998. - Vol. 1408. - pp. 278–289.
- Gehr P and Heyder J** Particle-Lung Interactions [Book]. - New York-Basel : Marcel Dekker INC., 2000. - p. 239.
- Goerke J** Lung surfactant [Journal] // Biochim. Biophys. Acta. - 1974. - Vol. 344. - pp. 241-261.
- Guzmán E [et al.]** Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Nanoparticles on the Surface Pressure Response of DPPC Monolayers [Journal] // J. Phys. Chem. C. - 2011. - 44 : Vol. 115. - pp. 21715–21722.
- Haagsman H P** Interactions of surfactant protein A with pathogens [Journal] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. - 1998. - Vol. 1408. - pp. 264–277.
- Harishchandra R K, Saleem M and Galla H J** Nanoparticle interaction with model lung surfactant monolayers [Journal] // J R Soc Interface. - 2010. - Suppl 1 : Vol. 7. - pp. S15–S26.
- Hills B A** The role of lung surfactant [Journal] // Br. J. Anaesth. - 1990. - Vol. 65. - pp. 13-29.
- Horowitz A D [et al.]** Preferential uptake of small-aggregate fraction of pulmonary surfactant in vitro [Journal] // Am J Physiol. - 1997. - Vol. 273. - pp. 468-477.
- Johansson J [et al.]** The NMR structure of the pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in an apolar solvent contains a valyl-rich alpha-helix [Journal] // Biochemistry. - 1994. - Vol. 33. - pp. 6015-6023.
- King R J and Clements J A** Surface active materials from dog lung. I. Method of isolation. [Journal] // Am J Physiol. - 1972. - 3 : Vol. 223. - pp. 707-714.
- Kramer A [et al.]** Distribution of the surfactant-associated protein C within a lung surfactant model film investigated by nearfield optical microscopy [Journal] // Biophysical Journal. - 2000. - Vol. 78. - pp. 458-465.
- LEFUR A and ARNAUD J-P** Les lipides polaires : actifs et vecteurs cosmétiques [Journal] // Oléagineux, Corps Gras, Lipides. - 2004. - 6 : Vol. 11. - pp. 436 - 439.
- Levitzky M G** Pulmonary Physiology [Book]. - [s.l.] : McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2003.
- Lyklema J** Fundamentals of Interface and Colloid Science: Liquid-Fluid Interfaces [Book]. - 2000. - Vol. Volume 3 : p. 3.30.

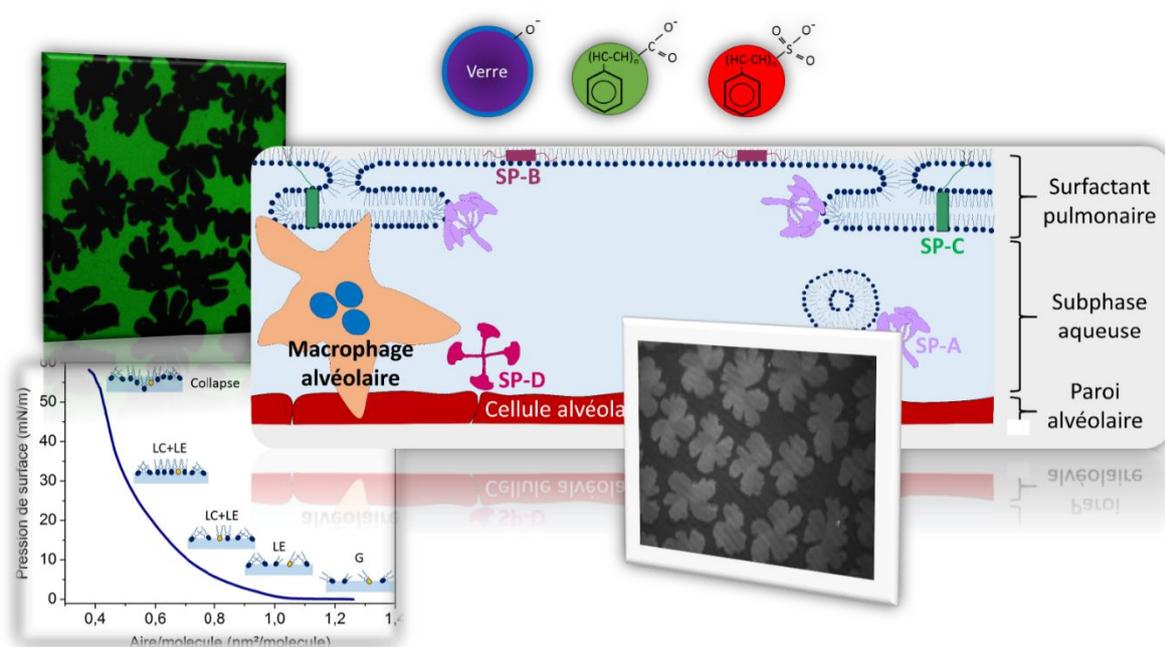
- Pastrana-Rios B [et al.]** A Direct Test of the "Squeeze-Out" Hypothesis of Lung Surfactant Function. External Reflection FT-IR at the Air/Wave Interface [Journal] // *Biochemistry*. - 1994. - 17 : Vol. 33. - pp. 5121–5127.
- Pastrana-Rios B [et al.]** External reflection absorption infrared spectroscopy study of lung surfactant proteins SP-B and SP-C in phospholipid monolayers at the air/water interface [Journal] // *Biophysical Journal*. - 1995. - Vol. 69. - pp. 2531-2540.
- Pattle R E** Properties, Function, and Origin of the Alveolar Lining Layer [Journal] // *Proc. R. Soc. Lond. B*. - 1958. - 931 : Vol. 148. - pp. 217-240.
- Pérez-Gil J** Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid–protein interactions [Journal] // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2008. - Vol. 1778. - pp. 1676–1695.
- Pérez-Gil J** Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid–protein interactions [Journal] // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 1998. - Vol. 1778. - pp. 1676–1695.
- Possmayer F** A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. [Journal] // *Am Rev Respir Dis*. - 1988. - 4 : Vol. 138. - pp. 990-998.
- Rapacchietta A V and Neumann A W** Force and free-energy analyses of small particules at fluid interfaces [Journal] // *Journal of Colloid an Interaface Science*. - 1976. - 3 : Vol. 59. - pp. 555-567.
- Reid Kenneth B.M.** Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes [Journal] // *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*. - 1998. - Vol. 1408. - pp. 290-295.
- Ruge C A** DISSERTATION: Bio-Nano Interactions in the Peripheral Lungs: Role of Pulmonary Surfactant Components in Alveolar Macrophage Clearance of Nanoparticles [Report]. - Saarbrücken : [s.n.], 2012.
- Schürch S [et al.]** Surfactant displaces particles toward the epithelium in airways and alveoli [Journal] // *Respiration Physiology*. - 1990. - 1 : Vol. 80. - pp. 17-32.
- Schürch S [et al.]** The surface-associated surfactant reservoir in the alveolar lining [Journal] // *Biol Neonate*. - 1995. - Vol. 67. - pp. 61-76.
- Schurch S, Goerke J and Clements J A** Direct determination of surface tension in the lung [Journal] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. - 1976. - Vol. 73. - pp. 4698–4702.
- Schürch S, Green F H.Y and Bachofen H** Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry [Journal] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. - 1998. - Vol. 1408. - pp. 180-202.
- Serrano A G and Pérez-Gil J** Protein–lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system [Journal] // *Chemistry and Physics of Lipids*. - 2006. - Vol. 141. - pp. 105–118.
- Strayer D S [et al.]** Antibody to surfactant protein A increases sensitivity of pulmonary surfactant to inactivation by fibrinogen in vivo [Journal] // *Am J Respir Crit Care Med*. - 1996. - 3 : Vol. 153. - pp. 1116-1122.
- Suzuki Y, Fujita Y and Kogishi K** Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant [Journal] // *Am Rev Respir Dis*. - 1989. - 1 : Vol. 140. - pp. 75-81.
- Takahashi A and Fujiwara T** Proteolipid in bovine lung surfactant: its role in surfactant function [Journal] // *Biochem Biophys Res Commun*. - 1986. - 2 : Vol. 135. - pp. 527-532.
- Tino M J and Wright J R** Interactions of surfactant protein A with epithelial cells and phagocytes [Journal] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. - 1998. - Vol. 1408. - pp. 241–263.
- Veldhuizen E J.A and Haagsman H P** Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics [Journal] // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2000. - Vol. 1467. - pp. 255-270.

Veldhuizen R [et al.] The role of lipids in pulmonary surfactant [Journal] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. - 1998. - Vol. 1408. - pp. 90–108.

Watkins J C The surface properties of pure phospholipids in relation to those of lung extracts [Journal] // Biochim Biophys Acta. - 1968. - 2 : Vol. 152. - pp. 293-306.

Wright J R Host Defense Functions of Pulmonary Surfactant [Journal] // Biology of the Neonate. - 2004. - 4 : Vol. 85. - pp. 326-332.

CHOIX DES PARTICULES ET DU MODELE DE SURFACTANT PULMONAIRE



Chapitre D

CHOIX DES PARTICULES ET DU MODELE DE SURFACTANT PULMONAIRE

Cette thèse vise d'analyser les mécanismes d'interaction des particules aéroportées avec le surfactant pulmonaire afin d'identifier la relation entre les propriétés physico-chimiques des particules et leur effets sur le fonctionnement normal du surfactant pulmonaire, c'est-à-dire leur « toxicité »

Dans ce contexte, l'objectif de ce quatrième chapitre est d'une part de choisir des particules d'usure modèle basées sur les caractéristiques des particules d'usure aéroportées et d'une autre part de réaliser et valider *ex vivo* un modèle de surfactant pulmonaire réaliste qui permet la simulation des cycles respiratoire

Table des matières

D.1 Introduction	59
D.2 Les particules modèle	59
D.2.1 Nature de particules	59
D.2.1.1 Particules négatives	60
D.2.1.2 Particules positives	60
D.2.2 Taille de particules	61
D.2.3 Charge de surface des particules	62
D.3 Le modèle du surfactant pulmonaire.....	64
D.3.1 Composition du surfactant modèle utilisé.....	64
D.3.2 La cuve de Langmuir	66
D.3.3 Visualisation du surfactant pulmonaire	68
D.3.3.1 Structure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide.....	68
D.3.3.2 Structure du surfactant pulmonaire déposé sur de substrats solides.....	73
D.3.4 Elasticité du surfactant pulmonaire.....	81
D.3.4.1 Compression lente	84
D.3.4.2 Sollicitations dynamiques de compression expansion: simulation des cycles respiratoires	86
D.3.4.3 Hystérésis respiratoire de compression-expansion.....	88
D.3.5 Rôle des protéines	89
D.4 Conclusions préliminaires	93
Travaux cités.....	95

D.1 Introduction

Dans la littérature spécialisée, très peu d'études portent sur la toxicité de particules issues de l'usure, et encore moins sur celles issues de l'usure utile des plaquettes de frein. De plus, ces études sont confrontées à la définition, voire au manque de paramètres, de grandeurs les décrivant, ainsi que leurs interactions avec l'organisme. Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est **dans une première partie** de choisir de manière réaliste des particules modèle avec des paramètres bien définis et connus en termes de taille, forme, chimie de surface qui simulent les particules d'usure aéroportées, susceptibles d'arriver et d'être déposées au niveau alvéolaire. **Dans une deuxième partie** l'objectif est de reproduire et valider un modèle réaliste de surfactant pulmonaire. Pour ce faire, il a fallu prendre en compte la composition lipidique et/ou protéique du surfactant pulmonaire capable de former des structures sous forme de monocouches sur la sous-phase aqueuse et de diminuer la tension de surface c'est-à-dire d'avoir un module d'élasticité latérale élevé (faible compressibilité).

D.2 Les particules modèles

En raison de la grande complexité et de la variabilité des paramètres décrivant les particules d'usure aéroportées dans l'environnement (voir chapitre A), il est très difficile d'étudier leurs interactions avec le surfactant pulmonaire et donc de déterminer leur toxicité. Par conséquent, l'utilisation de particules modèles avec des paramètres bien définis et connus en termes de taille, forme, chimie de surface est vraiment nécessaire pour définir les paramètres, les grandeurs décrivant les particules qui gouvernent les interactions avec le surfactant pulmonaire et déterminent ainsi leurs toxicité. Estimant que lors de leurs interactions avec le surfactant pulmonaire, la composition chimique des particules joue un rôle minimal, l'interaction étant gouvernée par leurs propriétés de surface, les particules modèles utilisées dans cette étude sont constituées de matériaux communs comme le polystyrène et le verre. Les particules de polystyrène ont été choisies du fait de leur grande variété de taille et propriétés de surface. En plus, elles peuvent être fluorescentes, ce qui facilite leurs visualisation par des techniques de microscopie de fluorescence. En revanche, les particules de verre ont été choisies car elles permettent le greffage des différents groupements chimiques pour modifier leurs propriétés de surface.

D.2.1 Nature des particules

La présente étude est focalisée sur le rôle de la charge de surface des particules sur leur toxicité en termes d'interactions avec le surfactant pulmonaire. Ce choix n'a pas été fait au hasard, mais parce qu'il est largement connu qu'une large gamme de particules générées lors du frottement sont électriquement chargées et que leur dépôt dans les voies respiratoires est influencée par cette charge électrique (Vincent, 1986). En revanche, sont moins connus les mécanismes par lesquels les particules d'usure aéroportées deviennent électriquement chargées, car les mécanismes impliqués sont complexes et variées. Les charges électriques sur les particules d'usure aéroportées détachées lors du frottement proviennent d'une combinaison entre le chargement électrostatique du 3^{ème} corps et la triboélectricité c'est-à-dire le transfert de charges (électrons) de la surface de contact d'un des deux matériaux à l'autre. En pratique il est difficile de distinguer entre ces deux mécanismes (Harper, 1967) (Hendricks, 1972). Par conséquent, pour cette étude, des particules modèles chargées négativement et positivement ont été utilisées.

D.2.1.1 Particules négatives

Trois types de particules négatives, contenant des groupements de surface différents ont été choisis (Fig. 1).

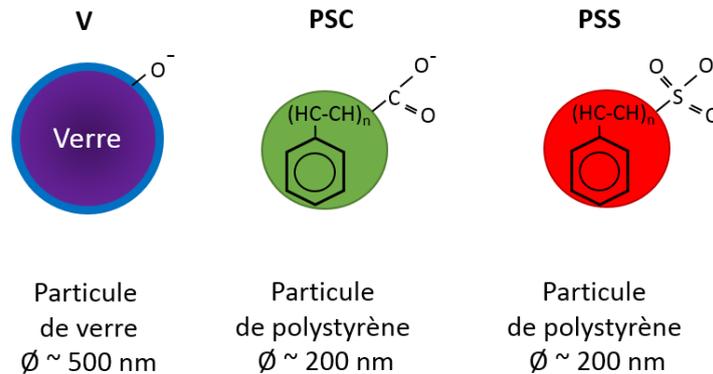


Fig. 1 Les particules négatives utilisées dans cette étude. Particules de verre (V), particules de polystyrène avec des groupements de surface carboxyle (PSC), particules de polystyrène avec des groupements de surface sulfate (PSS). Les particules PSC et PSS sont également fluorescentes (excitation/émission 505/515 nm)

- Particules de verre, avec un diamètre moyen d'environ 500 nm. Le verre possède sur la surface des groupements silanols SiOH . Par conséquent, les protons H^+ peuvent être libérés, laissant des groupements SiO^- sur la surface, rendant donc la surface de la particule négative. Ces particules seront appelées par la suite **V** (verre).
- Particules de polystyrène, avec un diamètre moyen d'environ 200 nm, contenant des groupements de surface carboxyle ($-\text{COO}^-$). Ces particules seront appelées par la suite **PSC**. Ces particules contiennent également un noyau fluorescent ce qui facilite leur visualisation par des techniques de microscopie de fluorescence.
- Particules de polystyrène, avec un diamètre moyen d'environ 200 nm, contenant des groupements de surface sulfate ($-\text{SO}_3^-$). Ces particules seront appelées par la suite **PSS**. Ces particules contiennent également un noyau fluorescent ce qui facilite leur visualisation par des techniques de microscopie de fluorescence.

D.2.1.2 Particules positives

Deux types de particules positives ont été utilisés :

- Particules de verre greffées. Les particules de verre de 500 nm ont été greffées avec des groupements chimiques (3-Aminopropyl)-triéthoxysilane. (APTES). Ces groupements ont été liés de manière covalente⁴⁴ aux groupements silanols SiOH présents sur la surface des particules de verre (Mirea, et al.). Ces particules seront appelées par la suite **VS** (verre silanisé).
- Particules de polystyrène, avec un diamètre d'environ 200 nm, contenant des groupements de surface amidine ($\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$). Ces particules seront appelées par la suite **PSA**.

⁴⁴ Voir l'Annexe 1

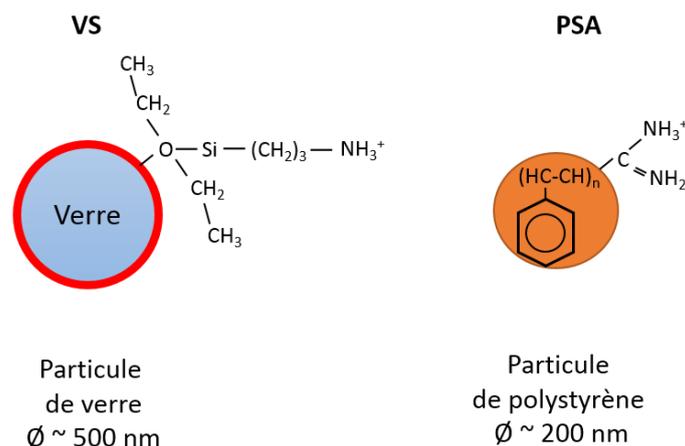


Fig. 2 Les particules positives utilisées dans cette étude

Pour faciliter la lecture, l'ensemble des particules dans cette étude est regroupé dans le tableau 1.

Charge	Matériau					
	Verre			Polystyrène		
	Appellation	Groupements de surface	Taille (nm)	Appellation	Groupements de surface	Taille (nm)
Négative	V	SiO-	500	PSC, PSS	COO-, SO ₃ -	200
Positive	VS	R- NH ₃ ⁺	500	PSA	R-NH ₃ ⁺	200

Tableau 1 L'ensemble de particules utilisées dans cette étude

D.2.2 Taille de particules

Les tailles des particules modèles ont été choisies de telle manière qu'elles correspondent aux particules d'usure aéroportées susceptibles de pénétrer et d'être déposées au niveau alvéolaire et donc d'interagir avec le surfactant pulmonaire. Sur la figure 3 il est montré la taille des différentes particules utilisées dans cette étude déterminée par la diffusion dynamique de la lumière⁴⁵. Pour chaque type de particules en suspension les mesures ont été répétées plusieurs fois pour une meilleure reproductibilité. On voit que les particules de verre (verre silanisé-VS et verre nue-V) ont des taille de 523±10.2 nm tandis que pour les particules de polystyrène la taille est comprise entre 207±0.2 nm pour PSS et 289.6±0.3 nm pour PSA, ce qui correspond aux spécifications du fournisseur et à la taille des particules d'usure aéroportées susceptibles de pénétrer et d'être déposées au niveau alvéolaire et donc d'interagir avec le surfactant pulmonaire.

⁴⁵ Voir l'Annexe 2

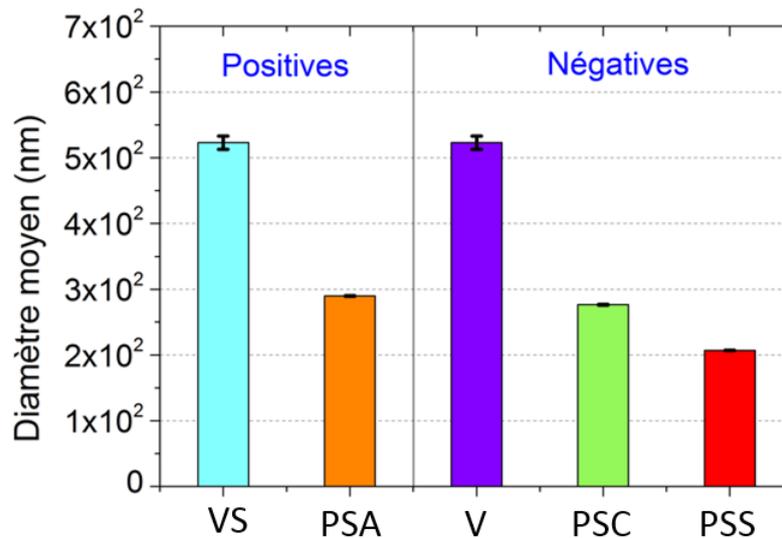


Fig. 3 Taille des particules mesurée par diffusion dynamique de la lumière. Leur taille correspond aux particules d'usure aéroportées susceptibles de pénétrer et d'être déposées au niveau alvéolaire. La barre d'erreur représente l'écart type de plusieurs mesures.

D.2.3 Charge de surface des particules

Comme les particules utilisées contiennent des groupements chimiques de surface instables, en milieu liquide, elles vont s'ioniser et déterminer l'apparition de charges de surface. Dans les études d'interactions avec le surfactant pulmonaire, il est important de mesurer cette charge électrique, car elle peut influencer la nature et la force de l'interaction. Cette charge de surface est contrebalancée par l'adsorption des ions de signe opposé sur la surface de la particule. Ces charges de signe opposées ont tendance à s'agglomérer à proximité de la particule en formant une « couche diffuse »⁴⁶. Elle est constituée d'ions libres qui se déplacent dans le fluide sous l'influence de l'attraction électrique et thermique. La couche diffuse influence le comportement des particules en suspension et par conséquent leurs interactions avec différentes molécules et structures comme par exemple le surfactant pulmonaire. Ainsi, pour mieux connaître les interactions des particules avec le surfactant pulmonaire, leur potentiel Zêta a été mesuré. Celui-ci constitue le potentiel au plan de glissement, c'est-à-dire au bord de la couche diffuse et il est proportionnel à la charge de surface⁴⁷ de la particule.

⁴⁶ En électrochimie, la couche de diffusion, selon l'IUPAC, est définie comme étant la "région au voisinage d'une électrode, où les concentrations sont différentes de leur valeur dans le reste de la solution.

⁴⁷ Le potentiel zêta n'est pas égal à la charge de surface, car celles-ci sont définies à des emplacements différents. Ces hypothèses d'égalité doivent être appliquées avec prudence. Néanmoins, le potentiel zêta est souvent la seule voie disponible pour la caractérisation des charges de surface.

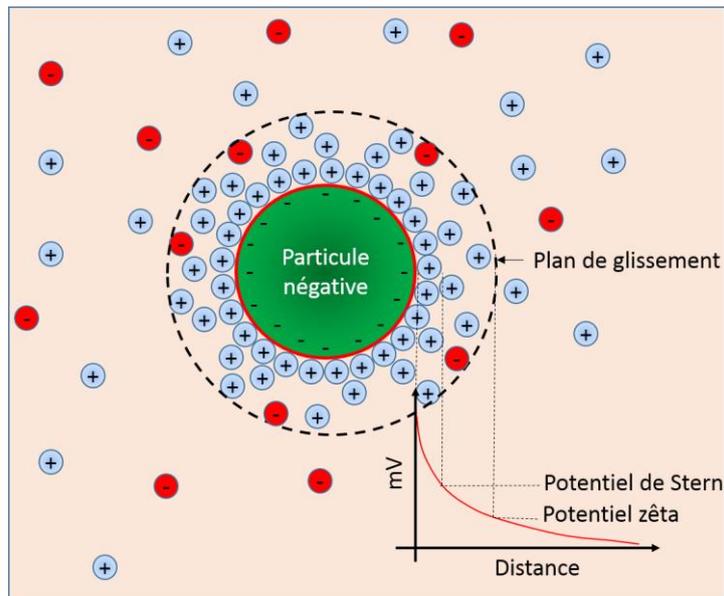


Fig. 4 Distribution des charges électriques autour d'une particule chargée négativement.
D'après (Wiki, 2014)

Comme le potentiel zêta est fortement dépendant de la nature du liquide dans lequel les particules sont dispersées, nous avons fait les mesures avec trois dispersants différents, qui sont :

- Eau ultrapure ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$),
- Tampon Tris pH 7.4. C'est un milieu qui a le même pH que le milieu biologique mais une pression osmotique nulle,
- Tampon Tris pH 7.4 contenant 150 mM NaCl. Il est considéré identique au milieu biologique.

Il faut mentionner que la mesure du potentiel zêta des particules de verre (V et VS) n'a pas été possible à cause de leur masse relativement grande qui entraîne leur sédimentation dans un temps court. Comme on peut voir sur la figure 5 et comme attendu, le potentiel zêta des particules PSA est positif et celui des particules PSC et PSS est négatif. Evidemment le potentiel diminue avec la quantité d'ions présents dans le milieu. Ainsi, dans le tampon Tris qui contient des cations Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) et des anions Cl^- , le potentiel zêta diminue à cause de l'adsorption des cations Tris sur la surface des particules négatives et des anions de Cl^- sur la surface de particules positives. Dans le tampon Tris avec 150 mM NaCl la diminution est encore plus prononcée à cause de la présence des ions Na^+ et Cl^- . On peut remarquer également une différence de potentiel zêta entre les particules PSC et PSS, les particules PSS étant plus négatives que les particules PSC, ceci étant probablement dû au type de groupement chimique présent sur la surface de la particule. On pourra alors s'attendre à des différences d'interaction avec le surfactant pulmonaire.

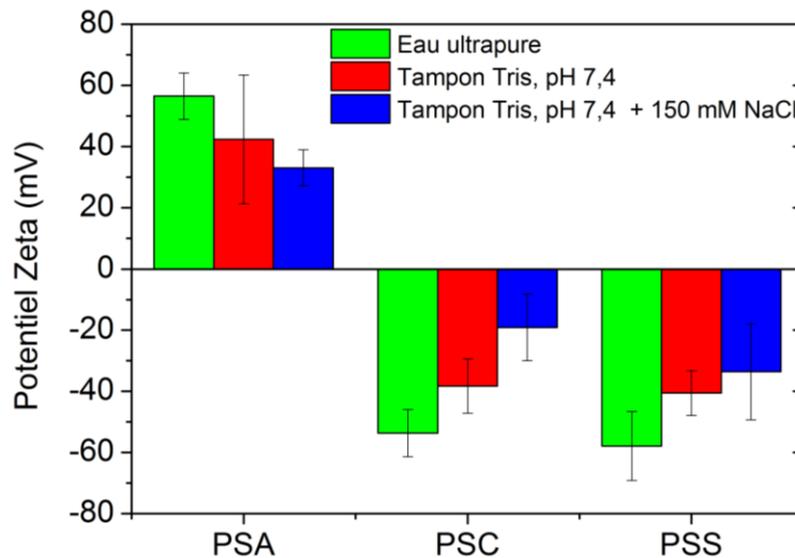


Fig. 5 Le potentiel zêta des particules de polystyrène mesuré par l'électrophorèse laser Doppler⁴⁸. La barre d'erreur représente l'écart type de plusieurs mesures.

D.3 Le modèle de surfactant pulmonaire

A cause de sa grande complexité chimique et structurale et du fait qu'il est continuellement soumis à des sollicitations de compression-expansion latérale (expiration-inspiration), le surfactant pulmonaire ne peut pas être étudié *in vivo*. Par conséquent, pour étudier la toxicité des particules, c'est-à-dire leurs interactions avec le surfactant pulmonaire, plusieurs études ont été menées au cours des dernières années sur des modèles *ex vivo*⁴⁹ (Goerke, 1974) (Putz, et al., 1994). Ainsi, certaines études proposent donc des modèles *ex vivo* obtenu en utilisant la cuve de Langmuir (Farnoud, et al., 2012) (Guzmán, et al., 2011) (Harishchandra, et al., 2010). Par conséquent, le modèle du surfactant pulmonaire utilisé dans notre étude de toxicité de particules d'usure aéroportées sera basé sur la structure et la composition définies dans le chapitre C qui sera obtenu en utilisant la cuve de Langmuir.

D.3.1 Composition du surfactant modèle utilisé

Le surfactant pulmonaire contient en masse 90% de lipides et 10% de protéines. Le lipide majoritaire est le DPPC (60%) responsable de la faible compressibilité (module d'élasticité élevé) du surfactant pulmonaire, Il contient aussi des lipides en phase fluide et des lipides négatifs comme fluidifiant. Pour simuler cette complexité chimique trois types de lipide ont été utilisés (Fig. 6):

- Lipides de type DPPC (Réf. 850355P Avanti Polar Lipids) qui forment à la température ambiante des structures en phase gel⁵⁰ à cause de la longueur et de l'absence des doubles liaisons des chaînes acyles qui forment les queues hydrophobes. La tête lipidique du DPPC est un **zwitterion**, c'est-à-dire qu'il présente sur la tête des charges électriques formelles de signes opposés : une charge négative du côté des queues et une charge positive du côté de la sous-phase,

⁴⁸ Voir l'annexe 3 « L'électrophorèse laser Doppler »

⁴⁹ Voir l'annexe 4 « Moyens de reproduire ex-vivo le surfactant pulmonaire »

⁵⁰ Cette phase est caractérisée par une mobilité presque nulle des molécules lipidiques à l'intérieur des structures (monocouche, bicouche, vésicule)

- Lipides de type DPPS (Réf. 110668 Avanti Polar Lipids) qui forment à la température ambiante des structures en phase gel, mais la tête présente deux charges négatives et une charge positive. C'est donc un **anion**,
- Lipides de type DLPC (Réf. 850335P Avanti Polar Lipids) qui forment à température ambiante des structures en phase fluide à cause des chaînes acyles très courtes qui empêchent une association compacte et ordonnée des lipides. Leur tête est également un **zwitterion**.

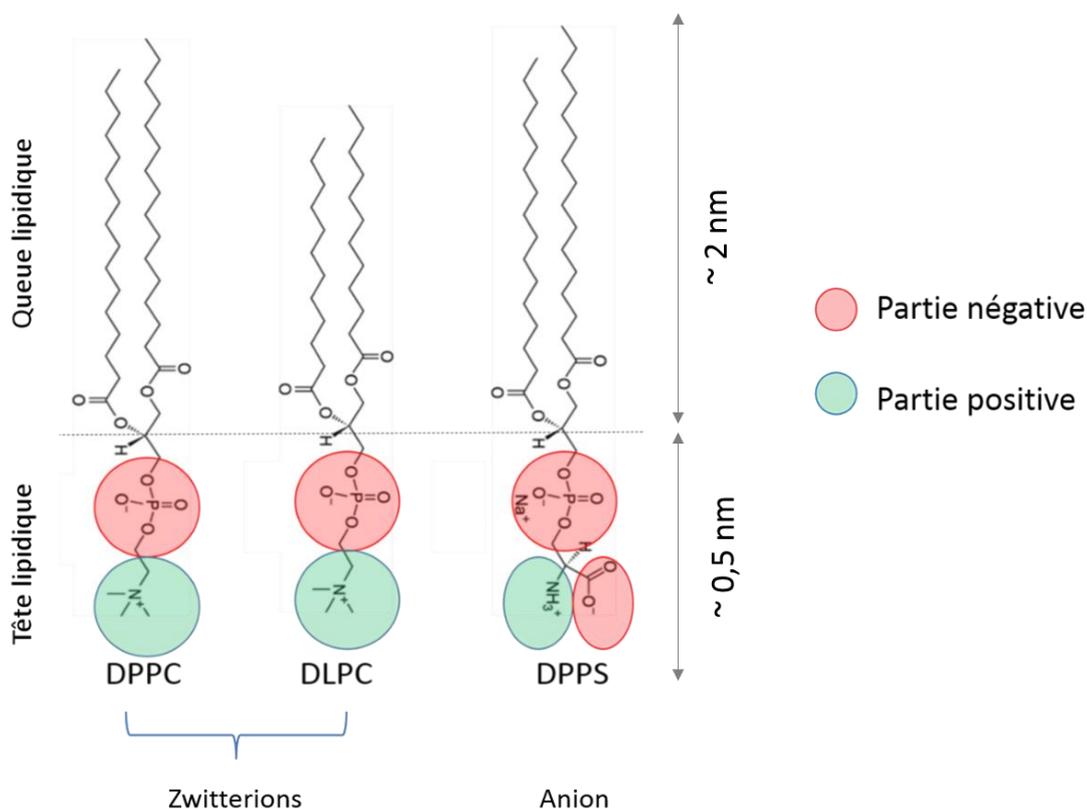


Fig. 6 Structure chimique des phospholipides utilisés pour reproduire le modèle ex vivo du surfactant pulmonaire

Lipide	Charge électrique de la tête à pH 7.4	Longueur de la queue (nombre C)	Température de transition	Phase à 25°C
DPPC	Neutre (0)	16	45°C	Gel
DPPS	Négative (-1)	16	54°C	Gel
DLPC	Neutre (0)	12	-2°C	Fluide

Tableau 2 Caractéristiques des lipides utilisés pour reproduire le modèle ex vivo du surfactant pulmonaire

Ces lipides ont été acquis sous forme de poudre et ont été gardés à l'abri du milieu oxydant (air) dans des fioles de 25mg à -20°. Pour obtenir le modèle du surfactant pulmonaire à partir de ces poudres, il faut d'abord obtenir des solutions lipidiques. Mais, comme il a été mentionné dans le chapitre C, les lipides sont insolubles dans des milieux aqueux. Ainsi, pour dissoudre la poudre lipidique, un solvant composé de chloroforme et d'éthanol en rapport volumique de 9 à 1 a été utilisé. La poudre lipidique contenue dans une fiole (25mg) a été ainsi dissoute dans un

volume de 10 ml de solvant. Ces solutions «stock» se conservent plusieurs mois au réfrigérateur en veillant bien à ce que le solvant ne s'évapore pas. A partir de la solution «stock», une solution diluée à 1 mM de mélange DPPC:DLPC:DPPS en rapport molaire 3:1:1 a été préparée. Elle sera utilisée pour préparer du surfactant pulmonaire dans la cuve de Langmuir.

D.3.2 La cuve de Langmuir

Pour reproduire la structure du surfactant pulmonaire de manière *ex-vivo*, la cuve de Langmuir a été utilisée. Le modèle du surfactant pulmonaire est constitué d'une couche unique des molécules (monocouche des lipides de 2.5 nm épaisseur) placée à la surface d'un liquide qui simule la sous-phase aqueuse placée dans une cuve en PTFE⁵¹. Cette monocouche, appelée par la suite surfactant pulmonaire, est formée par les molécules amphiphiles des lipides. Il s'agit donc d'un système bidimensionnel. La cuve en PTFE est munie de deux barrières mobiles qui balayent la sous-phase et comprime la monocouche de surfactant. Nous utilisons des barrières en PTFE DELRINTM, elles ont été recouvertes d'un film de polymère polyoxyméthylène plus hydrophile que le PTFE mais qui n'entraîne pas l'adsorption des lipides. Du fait de leur caractère légèrement hydrophile, l'eau forme un ménisque positif (mouillant) et pas négatif. On peut ainsi atteindre des pressions de surface plus élevées sans que la monocouche ait tendance à «plonger» sous les barrières. Pour obtenir la monocouche, un volume, calculé à l'avance de la solution lipidique est déposé délicatement goutte à goutte à la surface de la sous-phase à l'aide d'une microseringue. Après quelques instants, le solvant s'évapore et la monocouche de surfactant est obtenue. Par la suite, il est possible grâce aux barrières mobiles de compresser latéralement le surfactant pulmonaire en réduisant, à vitesse constante et fixée, la surface libre disponible pour les molécules (c'est-à-dire que l'on va ainsi diminuer l'aire moyenne par molécule, A). La monocouche va, de cette façon, devenir de plus en plus compacte et adopter des structures différentes lors de la compression.

⁵¹ Polytétrafluoroéthylène ou TEFLONTM

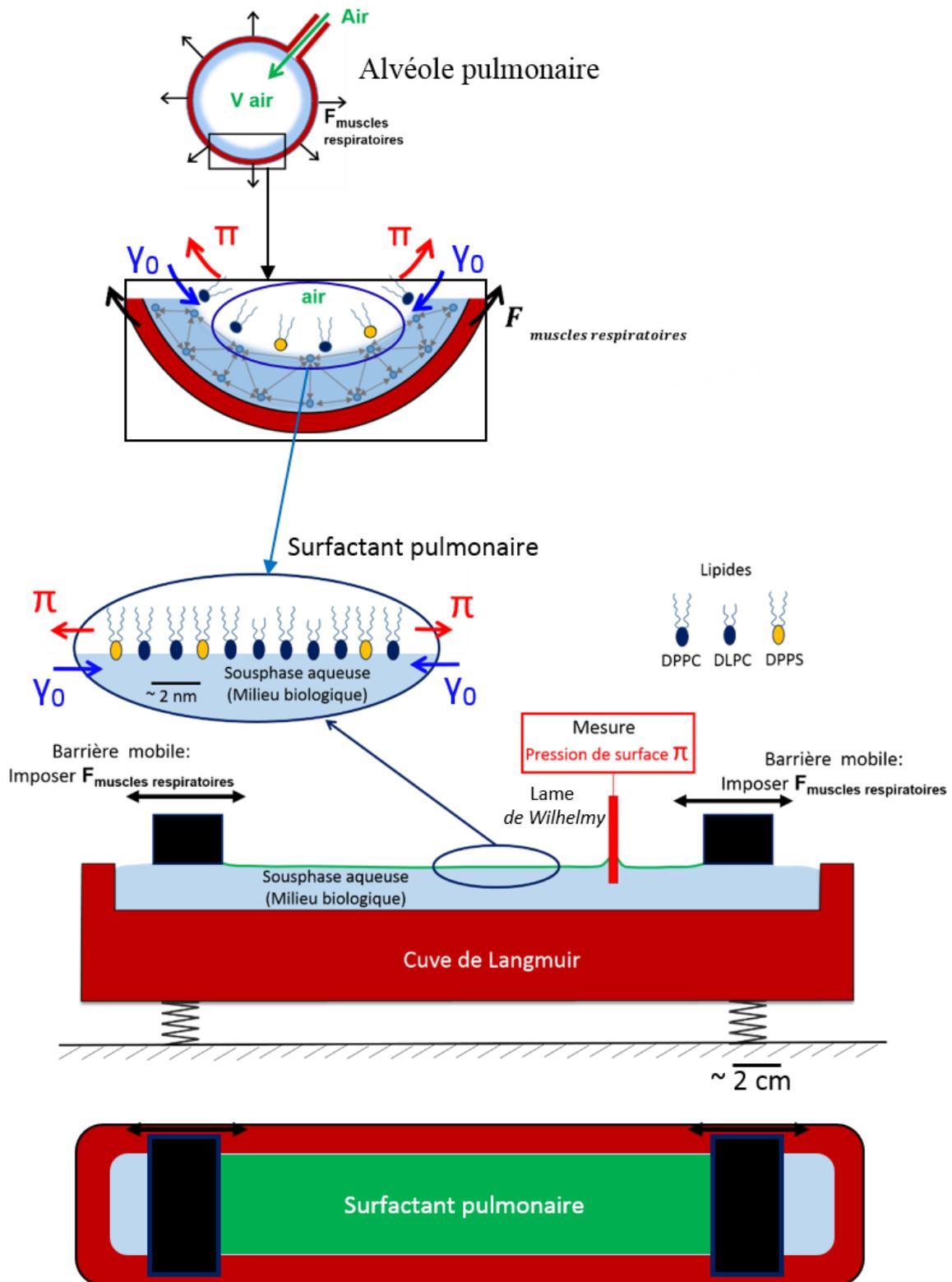


Fig. 7 Illustration de la cuve de Langmuir (KSV Minitrough). Le surfactant pulmonaire occupe l'aire délimitée par les barrières mobiles. La variation de la pression de surface en cours de compression (ou cycles de compression-expansion) est mesurés à l'aide d'un capteur (lame de Wilhelmy)

Lors de la compression latérale, l'indicateur le plus important des propriétés du surfactant pulmonaire est donné par la mesure de la pression de surface π , en utilisant la lame de Wilhelmy⁵². Bien que le surfactant pulmonaire soit un système 2D, il peut être caractérisé par différentes paramètres thermodynamiques, étant chacun analogue d'un paramètre caractérisant les systèmes 3D (Température T, Pression de surface π équivalente à la pression d'un système 3D et Aire de la surface équivalente au volume d'un système 3D) et permettant ainsi une correspondance avec les lois thermodynamiques habituelles (SAINT-MARTIN, 2007). Analogue à la courbe pression-volume d'un matériau 3D, il est donc possible de suivre la variation de la pression de surface π en fonction de l'aire A entre les deux barrières (ou l'aire par molécule) à température fixée. Ces courbes, appelées isothermes révèlent dans le cas du surfactant pulmonaire plusieurs phases :

- Phase Gaz (G) - les molécules sont très éloignées les unes des autres (l'aire par molécules lipidiques est de l'ordre de quelques centaines d'Angströms et par conséquent les molécules n'interagissent pas entre elles),
- Phase Liquide-Expansé (LE) - l'aire par molécule diminue au fil de la compression. Les molécules commencent à se rapprocher les unes des autres, mais il n'y a pas encore de réelle organisation dans la monocouche de surfactant pulmonaire,
- Phase de coexistence Liquide-Expansé + Liquide Condensé (LC+LE) - les molécules lipidiques sont suffisamment proches pour que, dans la monocouche de surfactant pulmonaire, apparaissent par nucléation des zones moléculaires plus condensées (LC). Au fur à mesure de la compression, ces zones LC augmentent en taille,
- Collapsus - si la compression continue, la monocouche n'est plus stable : elle s'effondre ou "collapse" (Gaines, 1966). Le film se met à former en surface de larges structures tridimensionnelles de façon irréversible ou les molécules de surfactant passent en sous-phase.

Il est possible de suivre ces différentes transitions de phases par différentes techniques de visualisation, comme par exemple la microscopie d'angle Brewster (BAM) et la microscopie de fluorescence.

D.3.3 Visualisation du surfactant pulmonaire

L'évolution de la structure du surfactant pulmonaire lors de la compression a été suivie en temps réel à l'interface air-liquide par la Microscopie d'Angle de Brewster (BAM).

D.3.3.1 Structure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide

La Microscopie d'Angle de Brewster a été utilisée pour visualiser les changements de la structure du surfactant pulmonaire lors de la compression latérale. Cette technique est basée sur les propriétés de réflexion de la lumière polarisée. Considérons l'interface air-liquide comme un dioptre plan séparant deux milieux d'indices n_1 et n_2 respectivement. La réflectivité d'un faisceau lumineux polarisé parallèlement au plan d'incidence est nulle à l'angle de Brewster. En présence d'une monocouche comme dans notre cas, le surfactant pulmonaire, à l'interface air-liquide, l'indice varie, et la réflectivité, bien que très faible, n'est plus nulle. L'analyse de la lumière émise permet donc d'obtenir des informations sur le film en termes de morphologie : monocouche fluide ou condensée, homogène ou non.

⁵² Voir l'Annexe 5 – Mesure de la pression de surface

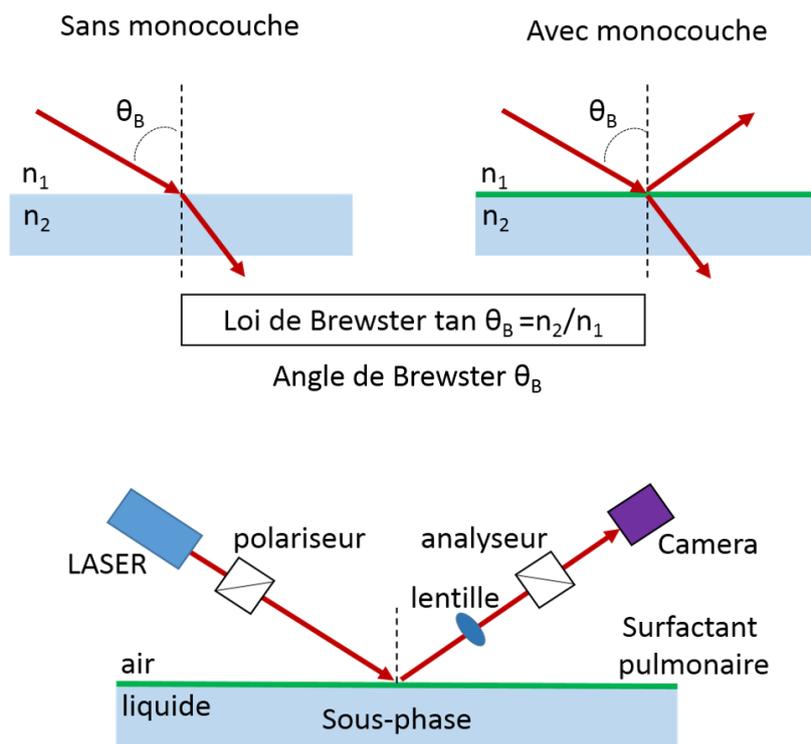


Fig. 8 Principe de la Microscopie d'Angle de Brewster (BAM). Cette technique utilise une lumière polarisée orientée à un angle bien précis, l'angle de Brewster θ_B . Dans les conditions de Brewster, le rayon réfléchi disparaît : dès lors qu'un film se forme à l'interface, ces conditions ne sont plus remplies, et le faisceau réfléchi réapparaît.

Sur les figures 9 et 10 sont montrées les isothermes de compression du surfactant pulmonaire et d'une monocouche de DPPC respectivement. A une grande aire par molécule aussi bien le surfactant pulmonaire que la monocouche de DPPC se trouvent dans la phase Gaz, quand les molécules sont très éloignées les unes des autres et la pression de surface est nulle. Sur les images de la microstructure correspondant à cette pression (Fig. 11A et Fig. 12A) les deux structures (surfactant pulmonaire et la monocouche de DPPC) sont homogènes, ce qui indique une structure uniforme. Au fur à mesure de la compression, la pression de surface augmente. Sur l'image BAM on observe l'apparition des petits domaines condensés à une pression d'environ 7mN/m (Fig. 11B et Fig. 12B). Ces domaines sont plus denses pour la monocouche de DPPC que pour la monocouche de surfactant pulmonaire et cela à cause de la quantité différente de DPPC dans les deux structures (100% dans la monocouche de DPPC et 60 % dans le surfactant pulmonaire).

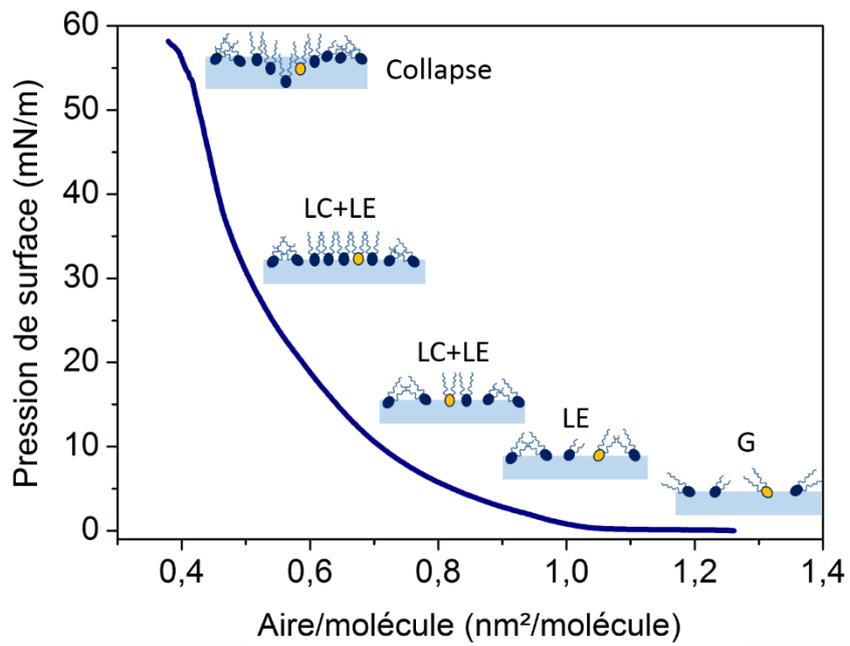


Fig. 9 L'isotherme de compression du surfactant pulmonaire

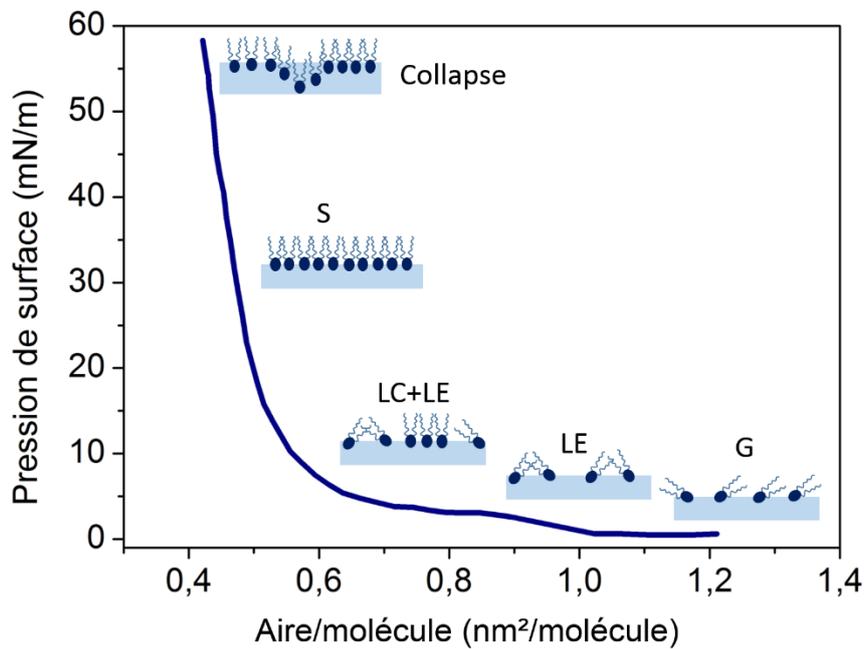


Fig. 10 L'isotherme de compression d'une monocouche de DPPC

Pour le surfactant pulmonaire les domaines condensés commencent à augmenter en taille jusqu'à la pression de surface de 20 mN/m. A partir de cette pression on observe que la taille des domaines reste constante jusqu'au collapse qui, dans ce cas apparait à la pression de surface d'environ 60 mN/m. En revanche, pour les domaines condensés de la monocouche de DPPC on remarque une légère augmentation en taille, mais à des pressions supérieures à 15 mN/m, ces domaines fusionnent en formant une monocouche en phase solide (Fig. 12E et F).

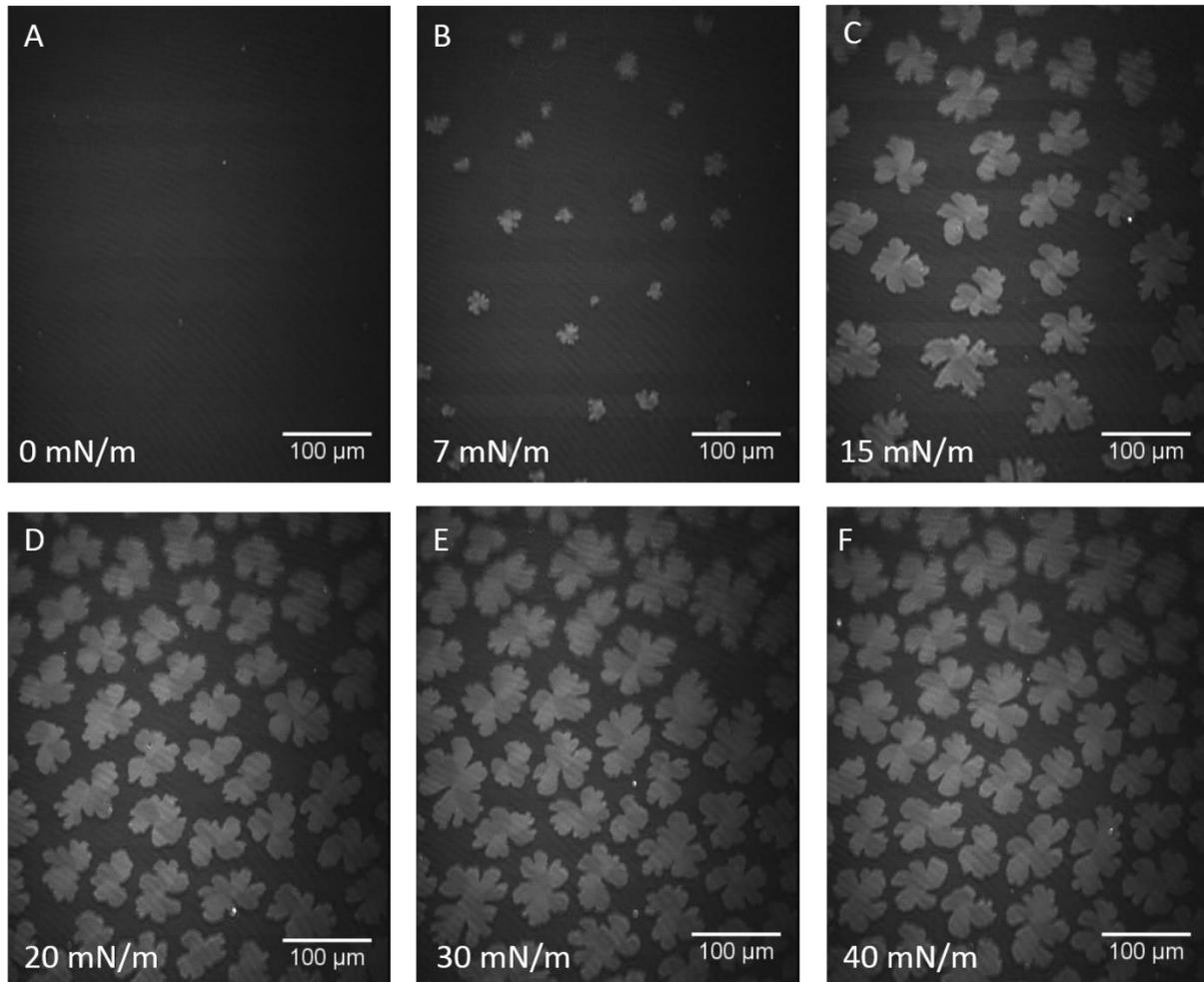


Fig. 11 Images BAM de la microstructure du surfactant pulmonaire lors de la compression latérale pour différentes pressions de surface A : 0mN/m, B : 7mN/m, C : 15mN/m, D : 20mN/m, E : 30mN/m, F : 40mN/m. On observe donc, que le surfactant pulmonaire étalé à l'interface air-liquide n'arrive pas en phase solide même à des pressions de surface élevées. Cela est dû à la présence des lipides en phase fluide (DLPC) et/ou des lipides anioniques (DPPS) qui fluidifient la monocouche de surfactant pulmonaire.

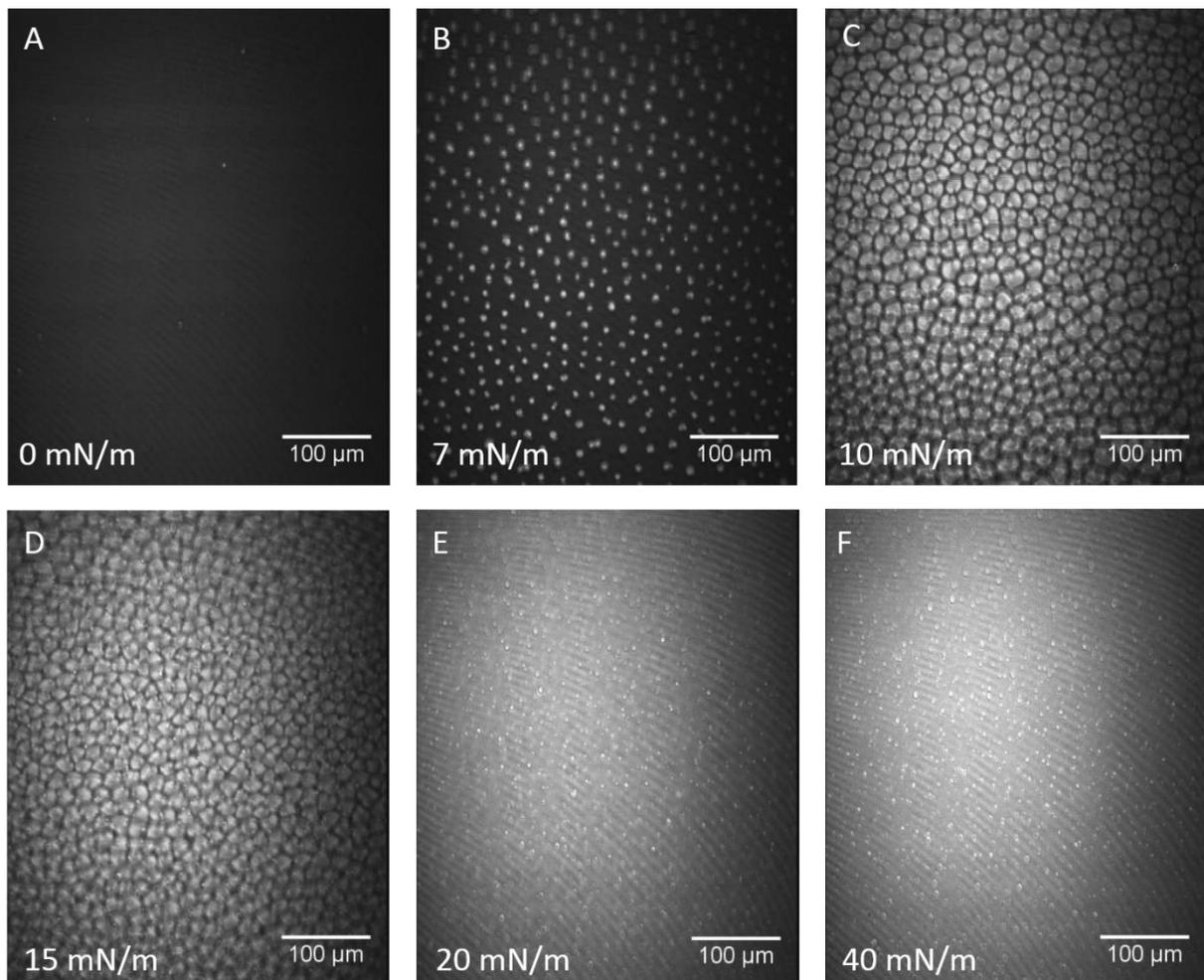


Fig. 12 Images BAM de la microstructure de la monocouche de DPPC lors de la compression latérale pour différentes pressions de surface A : 0mN/m, B : 7mN/m, C : 10mN/m, D : 15mN/m, E : 20mN/m, F : 40mN/m. On observe que les monocouches de DPPC arrivent en phase solide à des pressions supérieures à 15 mN/m.

Cela nous amène à l'hypothèse que les domaines condensés visibles dans la structure du surfactant pulmonaire sont constitués de lipides qui forment des structures en phase solide à la température ambiante comme le DPPC et probablement le DPPS (voir tableau 1) tandis que le fond noir est constitué par les lipides en phase fluide (DLPC). Mais, un simple calcul d'aire totale occupée par les domaines, par rapport à l'aire occupée par la phase fluide (fond noir), nous montre un rapport de 1 : 1 (Fig. 13). Il existe donc, dans la microstructure du surfactant pulmonaire 50% en surface de phase solide (les domaines) et 50% de phase fluide (le fond noir) tandis que le rapport molaire entre les lipides qui forment des structures en phase solide (DPPC et DPPS) et les lipides qui forment des structures en phase fluide (DLPC) est de 4 : 1.

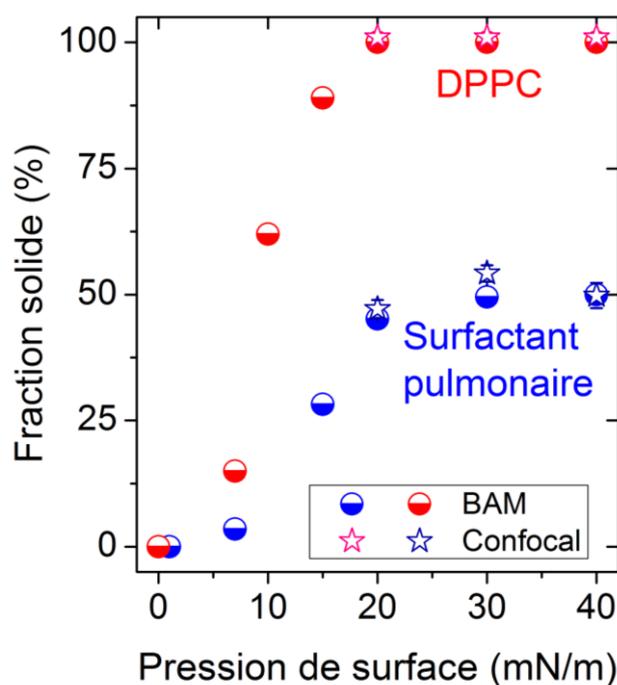


Fig.13 La variation de pourcentage de l'aire occupée par la phase condensée pour la monocouche de DPPC et pour le surfactant pulmonaire

Cela signifie que toutes les molécules de DPPC et/ou DPPS ne forment pas des domaines condensés même à des pressions de surface élevées et que la phase fluide (le fond noir) est constitué d'un mélange des trois lipides :

- le DLPC qui naturellement se trouve en phase fluide même à des pressions de surface élevées,
- une partie de DPPC qui n'arrive pas en phase solide à cause de la présence du DLPC qui le fluidifie,
- probablement une partie de DPPS.

En suivant la même logique, les domaines sont constitués :

- d'une partie de DPPC en phase solide,
- probablement une partie du DPPS.

Pour confirmer ces hypothèses des monocouches et des bicouches du surfactant pulmonaire ont été transférées sur des substrats de verre borosilicate (verre) ou de mica par la technique de Langmuir-Blodgett ou Langmuir-Schaeffer. Les échantillons ainsi obtenus ont été visualisés par différentes techniques comme la microscopie de fluorescence (confocale) ou la microscopie de force atomique.

D.3.3.2 Structure du surfactant pulmonaire déposé sur de substrats solides

Pour le dépôt des monocouches ou des bicouches de surfactant pulmonaire sur des substrats solides (verre ou mica), après l'obtention du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide, les barrières mobiles sont rapprochés une de l'autre (le surfactant pulmonaire est comprimé) à un taux de compression de 10 cm²/min jusqu'à une pression de surface préalablement choisie par l'utilisateur. Lors des transferts sous-phase → support, cette pression est maintenue constante par le déplacement des barrières, grâce à une boucle d'asservissement.

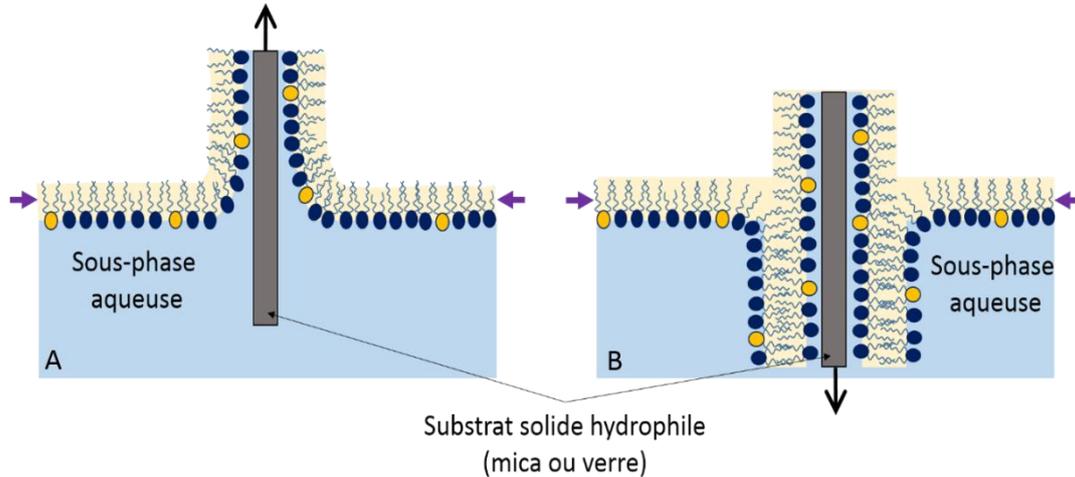


Fig.14 Principe de dépôt d'une monocouche (A) et d'une bicouche (B) par la technique de Langmuir-Blodgett

Après stabilisation de la pression de surface à la valeur préalablement choisie, le transfert du surfactant pulmonaire sur le substrat (mica ou verre) a lieu en sortant lentement (5 mm/min) le substrat de la cuve. Les lipides du surfactant pulmonaire sont entraînés à la surface du substrat hydrophile (Fig.14A). En principe, une deuxième monocouche, d'orientation inverse, peut être déposée sur la première en redescendant le substrat dans la cuve (Fig.14B). A tout instant, la technique permet de suivre le taux de transfert instantané T des molécules sur toute la longueur du substrat. Le taux de transfert global est calculé en fin de dépôt et donne une indication sur la qualité des monocouches. Il est défini par (SCOMPARIN, 2008):

$$T = \frac{\text{Aire balayée par les barrières}}{\text{Aire du substrat recouverte par la monocouche}} \quad (1.1)$$

Idéalement, le taux de transfert est de 1. Un taux inférieur signifie que la monocouche déposée est incomplète et un taux supérieur indique que la monocouche est plus dense sur le substrat qu'à l'interface air-liquide. Pour nos expériences, nous avons obtenues des taux de transfert de 1 pour mica et 0.9 verre pour la première monocouche déposée. Par contre, pour la deuxième monocouche déposée (pour former une bicouche) les taux de transfert sont légèrement inférieurs : 0.9 pour mica et 0.6 pour verre, donc des techniques qui permettent l'obtention des taux de transferts supérieurs devront être utilisées.

En conséquence, pour le transfert de la deuxième monocouche de surfactant pulmonaire sur verre nous avons utilisé la méthode de Langmuir-Schaeffer qui permet l'obtention des bicouches avec des taux de transfert supérieurs. Pour cela, le substrat sur lequel la première monocouche a été déposée par la méthode Langmuir-Blodgett, est amené horizontalement, parallèlement à la surface, au contact de la monocouche comme il est montré sur la figure 15. Des bicouches lipidiques d'une qualité supérieure sont ainsi obtenues.

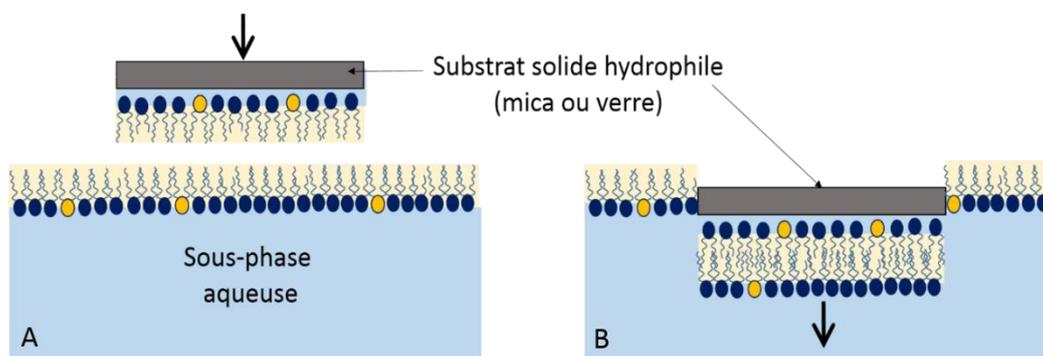


Fig. 15 Principe de dépôt d'une bicouche par Langmuir-Schaeffer : A. Monocouche déposée par Langmuir-Blodgett, B. Dépôt de la deuxième monocouche (pour former une bicouche) par Langmuir-Schaeffer

La microscopie de fluorescence a été utilisée pour visualiser la structure du surfactant pulmonaire déposé sur des substrats solides. Pour cela des marqueurs fluorescents spécifiques pour les bicouches lipidiques sont utilisés (Krüger, et al., 1999). Un marqueur fluorescent (fluorophore ou fluorochrome) est une molécule qui possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer sous forme d'énergie de fluorescence (lumière d'émission). Pour pouvoir séparer et détecter la lumière de fluorescence en microscopie de fluorescence il est essentiel que les deux longueurs d'onde, d'émission et d'excitation soient différentes. En fonction de la longueur d'onde de la lumière d'excitation et d'émission plusieurs types de marqueurs fluorescents sont disponibles. Dans notre étude deux d'entre eux ont été utilisés :

- Lipide NBD-PC (Réf. 810129P Avanti Polar Lipids) dont une partie fluorescente (NBD) est lié chimiquement sur l'une des queues lipidiques (fig. B.16a). Ces lipides sont excités par la lumière bleue (465 nm) et cette excitation le fait émettre une lumière verte (535 nm),
- Lipide Texas Red-DHPE (Réf. T-1395MP Molecular Probes) dont une partie fluorescente est liée chimiquement sur la tête lipidique (fig. B.16b). Ces lipides sont excités par la lumière verte (540 nm) et cette excitation le fait émettre une lumière rouge (566 nm).

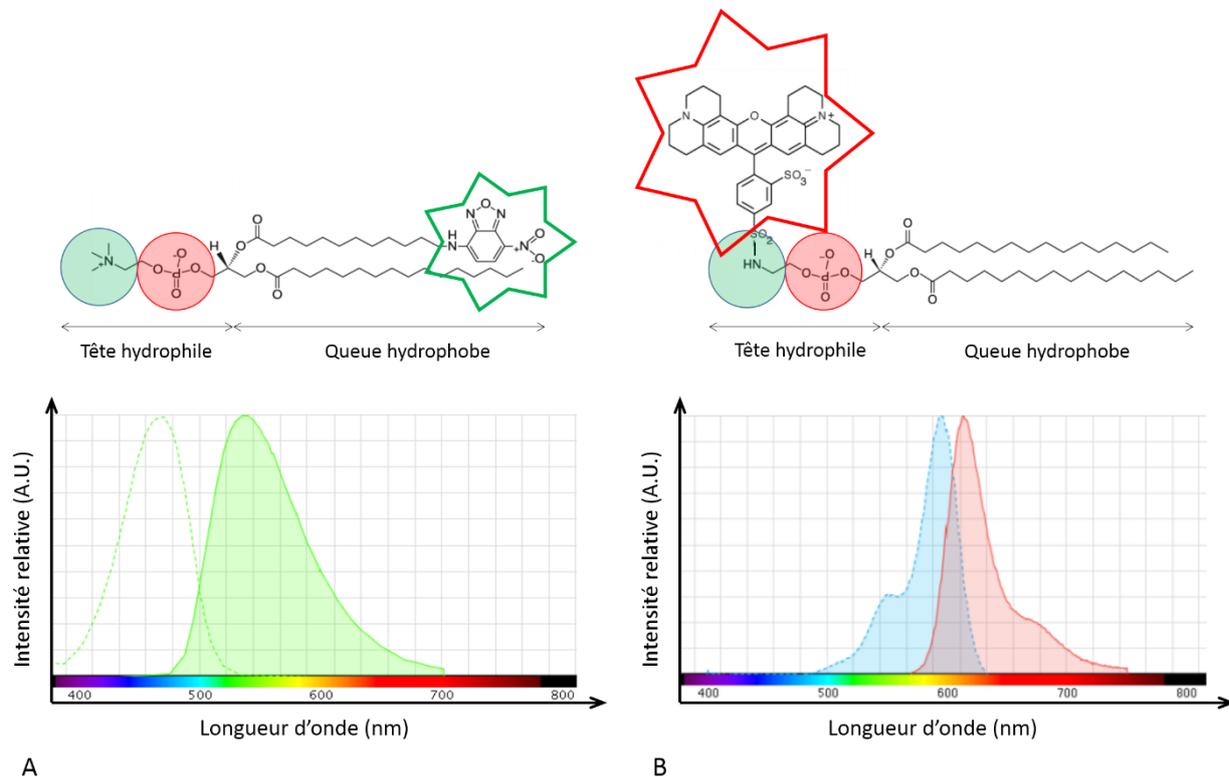


Fig. 16 Marqueurs fluorescents utilisés pour cette étude. A : structure chimique de la molécule de NBD-PC (lipide visible en lumière bleue) et le spectre d'excitation en pointillé et le spectre d'émission en ligne continué ; B : structure chimique de la molécule de Texas Red DHPE (lipide visible en lumière verte) et le spectre d'excitation en pointillé et le spectre d'émission en ligne continué.

Ces deux marqueurs fluorescents sont mélangés avec la poudre lipidique à une concentration molaire de 1%. Pour visualiser la structure du surfactant pulmonaire déposé sur des substrats solides de mica ou de verre et contenant un des marqueurs présentés auparavant, le microscope confocal droit (*Zeiss LSM700*) a été utilisé. Le principe de la microscopie confocale de fluorescence est schématisé sur la figure 17.

La source de lumière de ce microscope est un LASER. Le faisceau est concentré par une lentille qui balaie la surface en positionnant un sténopé devant le détecteur dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal passent le sténopé et participent à la formation de l'image, d'où le nom « confocal ». La lumière provenant des plans adjacents (floue) est arrêtée par les bords du trou. Il est ainsi possible d'obtenir une coupe optique nette correspondant uniquement au plan focal.

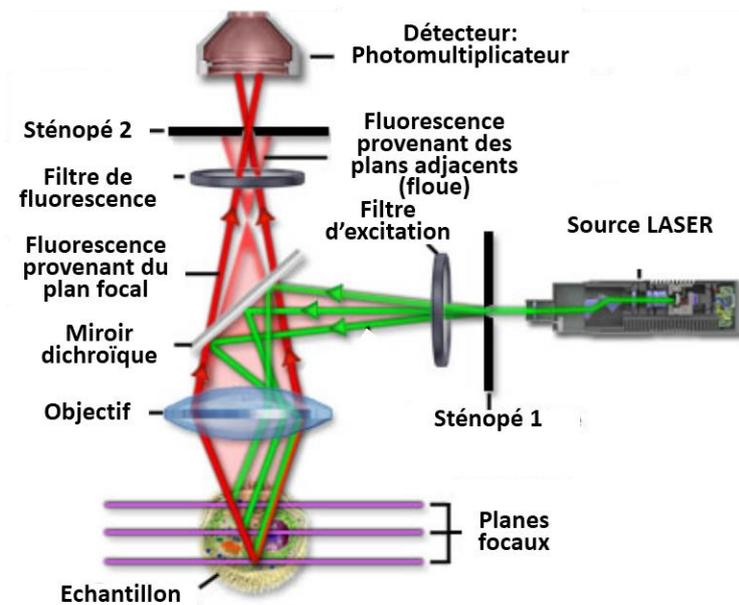


Fig. 17 Schéma du trajet optique de l'illumination sur un microscope confocal droit.
Adapté de (Zeiss, 2014)

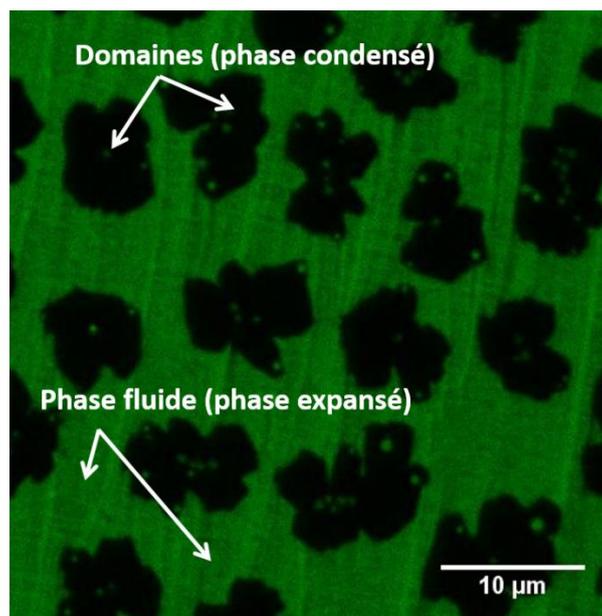


Fig. 18 Visualisation par microscopie de fluorescence de la monocouche de surfactant pulmonaire avec 1%NBD-PC déposé sur du mica.

Sur les images de microscopie de fluorescence on observe comme dans le cas des images BAM, la présence de domaines condensés. Ces domaines sont visibles grâce à une répartition différente du fluorochrome dans la monocouche de surfactant pulmonaire. A cause de la structure moléculaire du NBD-PC et du Texas Red DHPE qui sont plus solubles dans la phase fluide que dans la phase solide (Farnoud, et al., 2012) on peut observer la présence des domaines condensés noirs (non-fluorescents) sur un fond vert qui est la phase fluide (fluorescente).

En parallèle avec la microscopie de fluorescence, la microscopie de force atomique (AFM) a été utilisée pour déterminer la topographie du surfactant pulmonaire à l'échelle nanométrique. L'élément central de l'AFM est la sonde, qui est un micro-levier sur lequel est montée une pointe. Cette pointe interagit directement avec la surface étudiée. Par l'intermédiaire d'un tube piézo-électrique, la pointe peut être déplacée suivant les directions X et Y (dans le plan de l'échantillon) et Z (perpendiculairement à l'échantillon). Sur les figures 18, 19 et 20 sont présentées les images de fluorescence et les topographies AFM des monocouches de surfactant pulmonaire déposées sur du mica à différentes pressions de surface. Les deux types des images montrent la présence des domaines. Sur les profils AFM on peut observer une différence de hauteur entre les domaines condensés et le fond fluide. Cette différence est d'environ 0.8-1 nm qui résulte d'une part de la différence entre les queues hydrophobes du DPPC/DPPS (16 atomes de C) et les queues hydrophobes du DLPC (12 atomes de C) et d'autre part du fait que pour un lipide donné une monocouche en phase solide est plus épaisse qu'une monocouche en phase fluide.

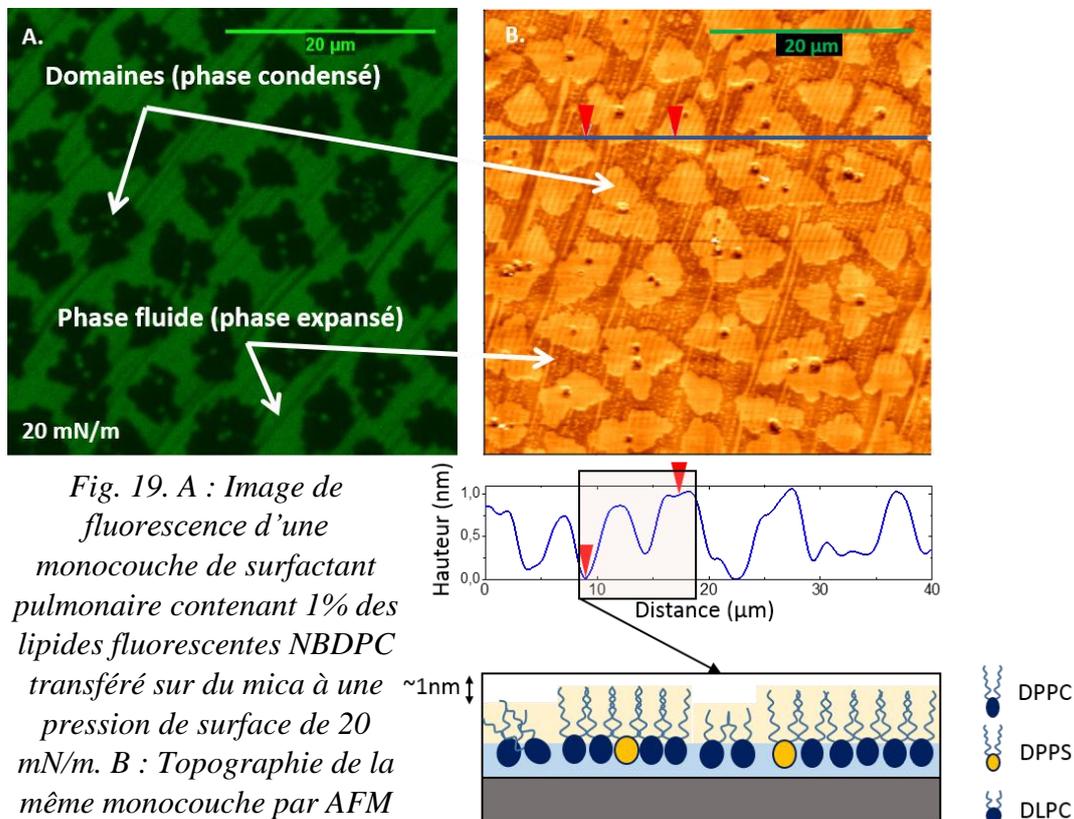


Fig. 19. A : Image de fluorescence d'une monocouche de surfactant pulmonaire contenant 1% des lipides fluorescents NBDPC transféré sur du mica à une pression de surface de 20 mN/m. B : Topographie de la même monocouche par AFM

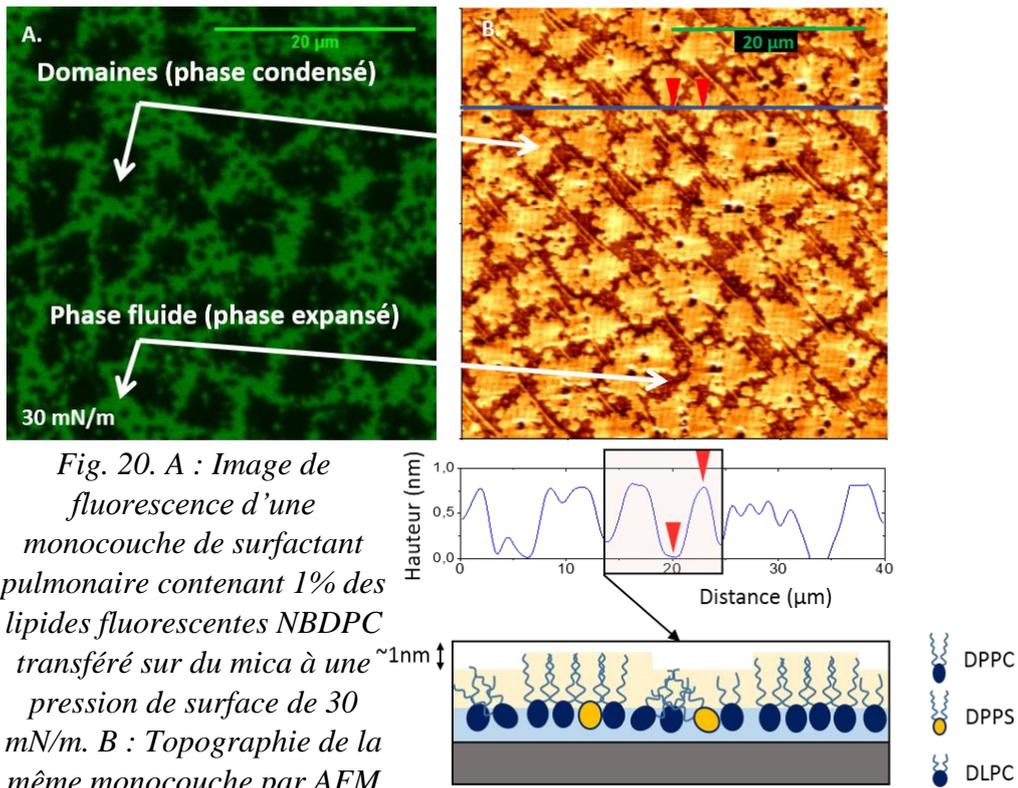


Fig. 20. A : Image de fluorescence d'une monocouche de surfactant pulmonaire contenant 1% des lipides fluorescents NBDPC transféré sur du mica à une pression de surface de 30 mN/m. B : Topographie de la même monocouche par AFM

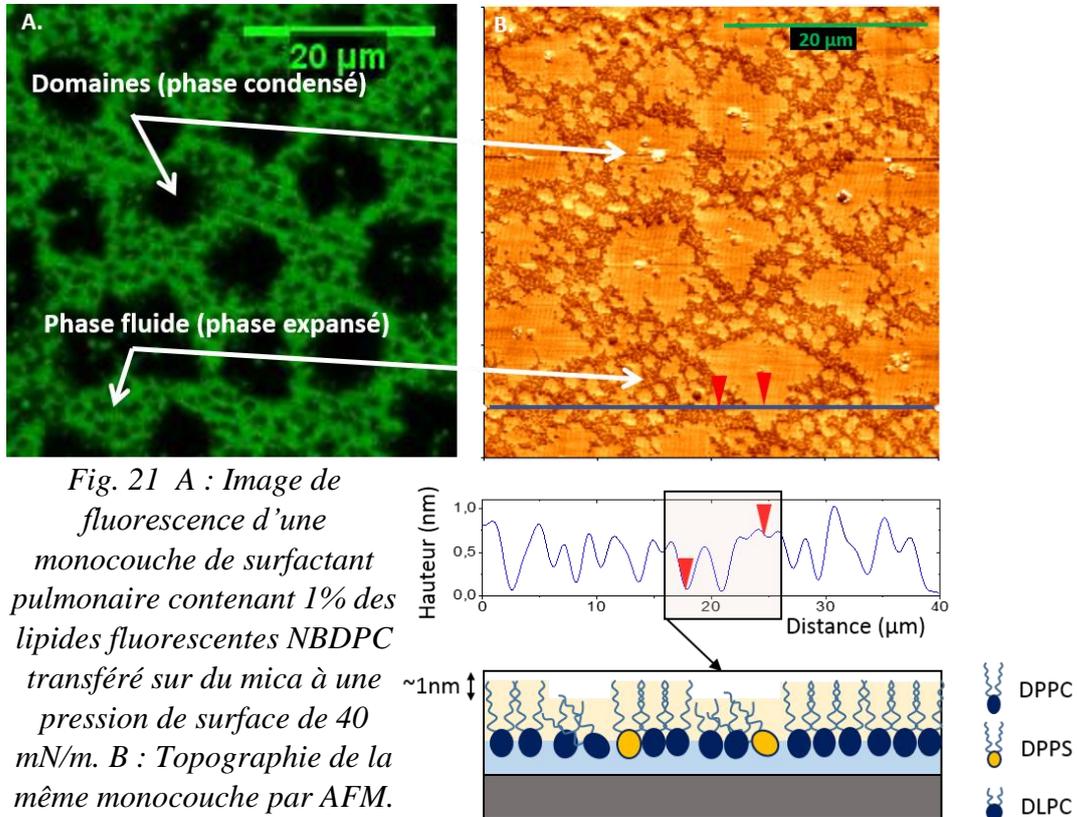


Fig. 21 A : Image de fluorescence d'une monocouche de surfactant pulmonaire contenant 1% des lipides fluorescents NBDPC transféré sur du mica à une pression de surface de 40 mN/m. B : Topographie de la même monocouche par AFM.

Cela confirme notre hypothèse que seulement une petite partie du DPPC et/ou DPPS arrive en phase condensée lors de la compression et forme les domaines, le reste du DPPC et/ou DPPS étant en phase expansée même à des pressions de surface élevées en formant avec le DLPC le fond fluorescent.

Evidemment, une question doit être posée : Comment est distribué le DPPS dans cette structure ? Pour répondre à cette question, la protéine annexine V (Rosengarth, et al., 1998) (Bandorowicz-Pikula, et al., 1996) qui se lie spécifiquement à la molécule de DPPS en présence des ions de Ca^{2+} a été utilisée⁵³. Cette protéine est marquée avec un groupement fluorescent qui est lié chimiquement à sa structure. Le groupement fluorescent utilisé est Alexa-Fluor 555 qui est excité par la lumière verte (555 nm) et cette excitation lui fait émettre une lumière rouge (565 nm). Ainsi, pour déterminer la distribution des molécules de DPPS dans le surfactant pulmonaire un protocole spécial a été mis en place. Pour ce faire une bicouche de surfactant pulmonaire contenant des lipides fluorescents NBDPC a été déposée sur une plaque de verre en utilisant la technique de dépôt Langmuir-Blodgett décrite précédemment (Fig.14)

Par la suite l'annexine V a été ajouté dans le milieu d'hydratation de la bicouche de surfactant pulmonaire. En présence des ions de Ca^{2+} dans le milieu, l'annexin V (contenant le groupement fluorescent) va se lier aux têtes de DPPS. Par conséquence, en microscopie confocale, en utilisant deux canaux de visualisation il est possible de visualiser à la fois :

- le marqueur fluorescent NBDPC (lumière verte) qui donnera des informations sur la répartition phase condensé/phase fluide. Il est possible donc de visualiser les domaines condensés (Fig.22a)
- le marqueur fluorescent Alexa Fluor (lumière rouge) qui donnera la répartition de l'annexine V et par conséquence la répartition des molécules de DPPS (fig.22b).

⁵³ Voir l'annexe 6 : Protocole de marquage avec l'annexine V

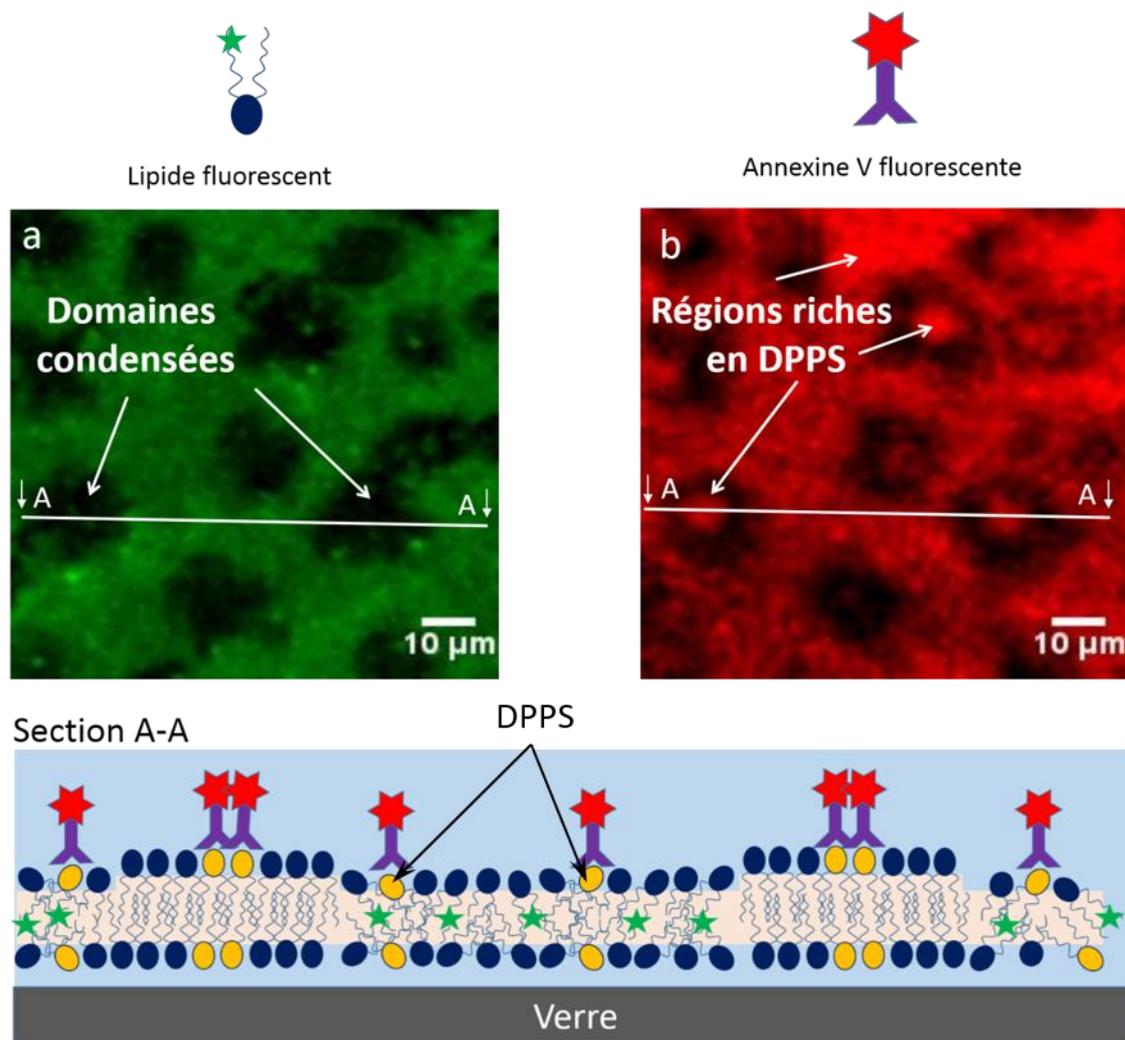


Fig.22 Images de fluorescence de la bicouche de surfactant pulmonaire déposé sur verre à une pression de surface de 40 mN/m.

a : visualisation en lumière verte (canal pour le marqueur fluorescent NBD-PC). *b* : visualisation en lumière rouge (canal pour le marqueur fluorescent Alexa-Fluor)

On peut donc observer qu'une grande partie de DPPS se trouve en phase expansée étant reparti principalement à l'extérieur des domaines condensés (dans la phase fluide), tandis qu'une autre partie se trouve sous forme condensée au centre des domaines. Cette répartition particulière des lipides anioniques peut avoir un impact sur l'interaction avec les nanoparticules, notamment sur l'interaction avec les particules chargées ce qui pourrait conduire à des modifications structurales du surfactant pulmonaire et à la modification de ses propriétés mécaniques (module d'élasticité).

D.3.4 Elasticité du surfactant pulmonaire

On a vu dans le chapitre dédié à la structure du surfactant pulmonaire (partie C) que son rôle principal est de diminuer la tension de surface de l'interface air-liquide de l'alvéole pulmonaire. Rappelons que la tension de surface est la force qui apparaît à l'interface parce-que les interactions entre les molécules de liquide sont beaucoup plus fortes que les interactions entre le liquide et l'air. Cette force a tendance à diminuer la surface de liquide (de la sous-phase), c'est-à-dire de diminuer le volume de l'alvéole pulmonaire et donc de diminuer la capacité

respiratoire. Le surfactant pulmonaire s'interpose à l'interface air-liquide en créant une pression de surface, c'est-à-dire des forces de répulsion latérale qui s'opposent à la force de diminution du volume de l'alvéole. Pour résumer, d'un point de vue mécanique, un surfactant pulmonaire efficace doit avoir une faible compressibilité (pour pouvoir s'opposer à la force de diminution du volume de l'alvéole pulmonaire), ce qui veut dire un grand module d'élasticité. Par conséquent, par la suite la mesure du module d'élasticité du surfactant pulmonaire pour deux types de sollicitations (compression lente et sollicitations dynamiques de compression-expansion qui simulent les cycles respiratoires) va être présentée. La compression lente permettra, en utilisant des monocouches lipidiques de compositions différentes, de déterminer le module d'élasticité de chaque phase constituante du surfactant pulmonaire (phase expansée, et phase condensée). En revanche, les sollicitations dynamiques de compression-expansion (expiration-inspiration) permettront de déterminer le module d'élasticité du surfactant pulmonaire pendant les cycles respiratoires.

Pour ce faire, le modèle développé par Behroozi pour la compression unilatérale peut être utilisé dans le cas des monocouches de Langmuir (Behroozi, 1996) (Fig. 23).

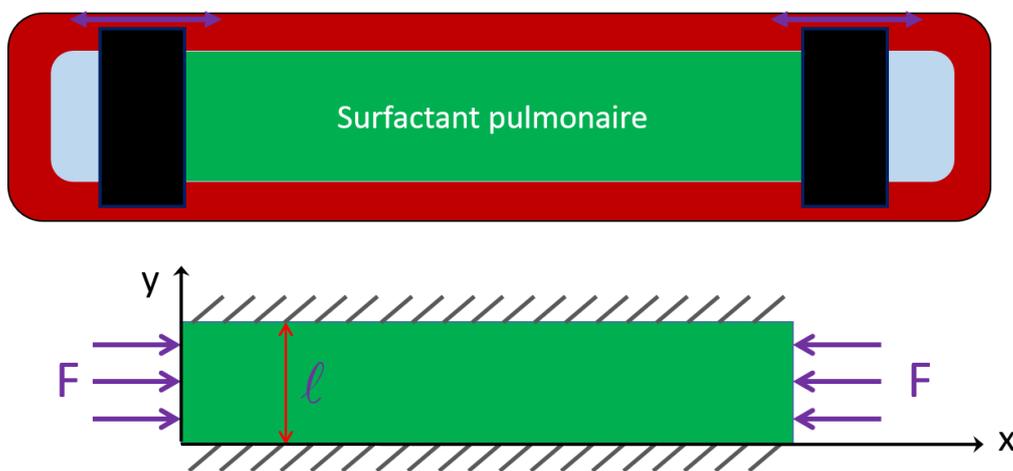


Fig. 23 Représentation schématique du surfactant pulmonaire sous compression unilatérale

Quand le surfactant pulmonaire est déformé par l'action des barrières, l'énergie libre du système peut s'exprimer par:

$$W = W_0 + \frac{1}{2} \lambda u_{ii}^2 + \mu u_{ik}^2 \quad (1.2)$$

où W_0 est l'énergie libre du surfactant pulmonaire non déformé, u_{ii} et u_{ik} sont les tenseurs de déformations et λ et μ sont les coefficients de Lamé (Wiki, 2014) qui caractérisent la réponse élastique des matériaux.

En 2-D l'équation (1.2) peut être écrite de la manière suivante :

$$W = W_0 + \frac{1}{2} \lambda (u_{xx} + u_{yy})^2 + \mu (u_{xx}^2 + u_{yy}^2 + u_{xy}^2) \quad (1.3)$$

En sachant que le tenseur de stress σ_{ik} est lié au tenseur de déformation par la relation :

$$\sigma_{ik} = \frac{\partial W}{\partial u_{ik}} = \lambda u_{ii} \frac{\partial u_{ii}}{\partial u_{ik}} + 2\mu u_{kk} \quad (1.4)$$

En dérivant l'équation (1.3) on obtient :

$$\sigma_{xx} = \lambda(u_{xx} + u_{yy}) + 2\mu u_{xx} \quad (1.5)$$

$$\sigma_{yy} = \lambda(u_{xx} + u_{yy}) + 2\mu u_{yy} \quad (1.6)$$

$$\sigma_{xy} = 2\mu u_{xy} \quad (1.7)$$

Dans la même logique les tenseurs de déformation s'expriment :

$$u_{xx} = \frac{1}{2\mu} \left[\sigma_{xx} - \frac{\lambda}{2(\lambda + \mu)} (\sigma_{xx} + \sigma_{yy}) \right] \quad (1.8)$$

$$u_{yy} = \frac{1}{2\mu} \left[\sigma_{yy} - \frac{\lambda}{2(\lambda + \mu)} (\sigma_{xx} + \sigma_{yy}) \right] \quad (1.9)$$

$$u_{xy} = \frac{1}{2\mu} \sigma_{xy} \quad (1.10)$$

Comme dans notre cas il s'agit d'une compression unilatérale, comme il est montré dans la figure 23, on peut déduire que :

$$\sigma_{xx} = -P \quad (1.11)$$

$$\sigma_{yy} = ? \quad (1.12)$$

$$\sigma_{xy} = 0 \quad (1.13)$$

où P est bien-sûr la pression appliquée (la force F sur l'unité de longueur l), analogue à la pression dans le cas 3D.

Ainsi, en utilisant les équations (1.8) et (1.9) on obtient :

$$u_{xx} = \frac{1}{2\mu} \left[-P - \frac{\lambda}{2(\lambda + \mu)} (-P + \sigma_{yy}) \right] \quad (1.14)$$

$$u_{yy} = 0 = \frac{1}{2\mu} \left[\sigma_{yy} - \frac{\lambda}{2(\lambda + \mu)} (-P + \sigma_{yy}) \right] \quad (1.15)$$

Dans l'équation (1.15) on peut extraire :

$$\sigma_{yy} = -P \left(\frac{\lambda}{\lambda + 2\mu} \right) = -P\nu \quad (1.16)$$

où ν est le coefficient de Poisson.

En substituant σ_{yy} de l'équation (1.16) dans l'équation (1.14) on peut écrire :

$$u_{xx} = \frac{1}{2\mu} \left[-P - \frac{\lambda}{2(\lambda + \mu)} (-P - P\nu) \right] \quad (1.17)$$

Le module d'élasticité E est défini comme le rapport entre σ_{xx} et u_{xx} donc, $E = -P/u_{xx}$. Après quelques calculs on obtient :

$$E = (2\mu + \lambda) \quad (1.18)$$

Si par la suite on calcule la pente de l'isotherme de compression (fig. 9) on obtient :

$$\frac{\Delta\Pi}{\Delta A} = -\frac{P}{\frac{\Delta A}{A}} A^{-1} = \frac{-P}{\frac{dx}{x}} A^{-1} = \frac{-P}{u_{xx}} A^{-1} = \frac{2\mu + \lambda}{A} = \frac{E}{A} \quad (1.19)$$

Donc, on peut calculer le module d'élasticité du surfactant pulmonaire à partir des isothermes de compression en utilisant :

$$E = -A \frac{\Delta\Pi}{\Delta A} \quad (1.20)$$

où A est l'aire occupé par chaque molécule lipidique (aire/molécule) et le signe '-' est utilisé par convention.

D.3.4.1 Compression lente

La compression lente a été imposée, aux monocouches lipidiques de composition différente, afin de déterminer le module d'élasticité de chaque phase constituante du surfactant pulmonaire (phase expansée, et phase condensée). Ainsi, pour déterminer le module d'élasticité de la phase :

- condensée, une monocouche de DPPC a été utilisée. Dans cette monocouche les molécules lipidiques sont dans un état ordonné qui favorise les interactions cohésives entre celles-ci,
- expansée, une monocouche de DLPC a été utilisée. Dans cette monocouche, les molécules lipidiques sont dans un état désordonné, assez éloignées les unes des autres, donc il n'y a pas encore de réelle organisation à l'intérieur de la monocouche.

La compression lente se fait à une vitesse constante à l'interface air-liquide de la cuve de Langmuir. Dans nos expériences nous avons utilisées des taux de compression de 20 cm²/min, (0.094 nm²/molécule/min). Des isothermes de compression ont été enregistrées, comme décrit précédemment, c'est à dire en mesurant la pression de surface pendant la compression latérale et leur module d'élasticité a été calculé en utilisant l'équation (1.20). Sur la figure 24 sont montrées les valeurs du module d'élasticité des différentes monocouches à des pressions de surface supérieures à 30 mN/m. Cette pression a été choisi car au-delà aucune modification de la structure de la monocouche n'est observé.

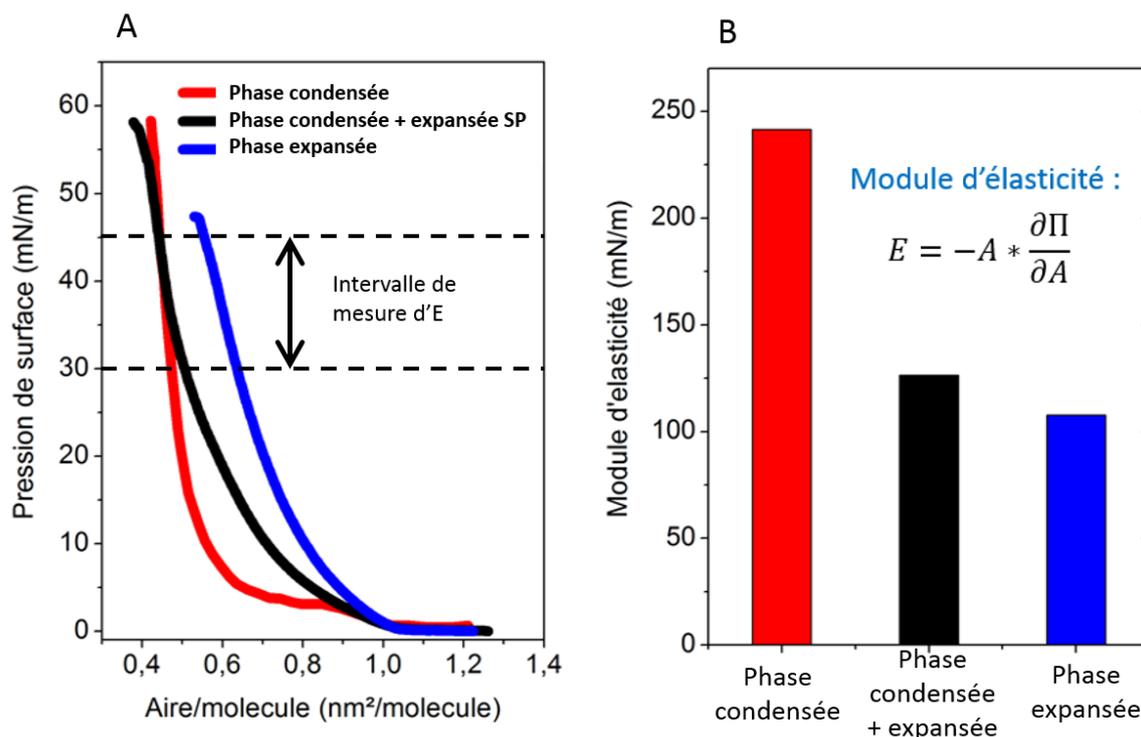


Fig. 24 A. Isothermes de compression de différentes monocouches lipidiques étudiées : DPPC qui à des grandes pressions de surface est en **phase condensée**, SP (surfactant pulmonaire), qui à des grandes pressions est une mixture de **phase condensée + phase expansée**, DLPC qui à des grandes pressions de surface est en **phase expansée**. B. Comparaison entre le module d'élasticité de ces monocouches lipidiques mesuré à des pressions supérieures à 30 mN/m

On note qu'il y a des différences entre le module d'élasticité de la phase condensée et la phase expansées. Ainsi, la phase condensée a un module d'élasticité beaucoup plus grand que la phase expansée ($E_{\text{phase condensée}} = 240 \text{ mN/m}$ tandis que $E_{\text{phase expansée}} = 107 \text{ mN/m}$, les deux valeurs à une pression de surface de supérieure à 30 mN/m). Cette différence peut être expliquée par le fait que dans une monocouche en phase condensée les molécules lipidiques sont dans un état ordonné qui favorise les interactions cohésives entre celles-ci en rigidifiant sa structure. En revanche, dans une monocouche en phase expansée les molécules lipidiques se trouvent dans un état désordonné, les interactions entre celles-ci étant faibles, la structure est plus déformable.

Dans le cas du surfactant pulmonaire la présence des lipides en phase fluide (DLPC), des lipides anioniques (DPPS) et des lipides en phase solide (DPPC) induit une séparation de phase traduite par la présence des domaines condensés (Fig.25). Ainsi, le surfactant pulmonaire, contenant les deux phases (condensée et expansée), a un module d'élasticité compris entre le module d'élasticité de la phase condensée et celui de la phase expansée, ce qui pourrait suggérer une efficacité supérieure à une monocouche en phase expansée mais inférieure à une monocouche en phase condensée. En effet, la présence des lipides qui fluidifient et qui ainsi diminuent le module d'élasticité du surfactant pulmonaire dans les alvéoles pulmonaire par rapport à la monocouche de DPPC est un compromis entre la **rigidité** (module d'élasticité élevé) nécessaire pour une bonne efficacité et la **fluidité** nécessaire pour une bonne adsorption à l'interface air-liquide. Ces deux conditions sont un prérequis nécessaire pour un bon fonctionnement du surfactant pulmonaire sous sollicitations dynamiques (cycles respiratoires).

Surfactant pulmonaire



Fig. 25 Image BAM du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide de la cuve de Langmuir Sa structure est constituée des domaines des lipides condensés ($E \uparrow$) contenant comme on l'a vu auparavant du DPPC en phase solide et du DPPS au centre des domaines. Ces domaines sont repartis dans une masse de phase fluide ($E \downarrow$) constituée d'un mélange de DPPC/DLPC/DPPS dans un état désordonné.

D.3.4.2 Sollicitations dynamiques de compression expansion: simulation des cycles respiratoires

Pour simuler les cycles respiratoires, le modèle de surfactant pulmonaire a été soumis à des sollicitations apparemment harmoniques de compression-expansion à l'aide des deux barrières mobiles. Pour une description plus détaillée de la méthode le lecteur est invité à consulter les références (Monroy, et al., 1998) (Hilles, et al., 2006).

Brièvement, la déformation imposée est de type sinusoïdal d'amplitude u_0 et de période $2\pi/\omega$, l'aire occupé par chaque molécule lipidique du surfactant pulmonaire variant de la manière suivante:

$$A(t) = A_0 \left[1 + \frac{u_0}{2} \sin(\omega t + \Phi_u) \right] \quad (1.21)$$

où A_0 étant l'aire/molécule initiale, $u_0 = (A-A_0)/A_0$ étant la déformation relative, ω est la fréquence du mouvement sinusoïdal et Φ_u représente la phase initiale.

La réponse en pression de surface du surfactant pulmonaire suit également une variation sinusoïdale avec la même fréquence que la sollicitation imposée (Lopez-Montero, et al., 2012).

$$\Pi(t) = \Pi_0 + \frac{\varepsilon_0}{2} \sin(\omega t + \Phi_\pi) \quad (1.22)$$

où Π_0 est la pression de surface moyenne, ε_0 est l'amplitude de la variation de pression de surface et Φ_π est un facteur de phase qui prend en compte le retard dû aux phénomènes viscoélastiques. En effet, pour un matériau purement élastique la déformation et la réponse en pression sont en phase, c'est-à-dire $\Phi_\pi - \Phi_u = 0$. En revanche, pour un matériau purement visqueux $\Phi_\pi - \Phi_u = 90^\circ$ ($\pi/2$ radians). Un matériau viscoélastique a un comportement entre un matériau purement élastique et un matériau purement visqueux et dans ce cas le déphasage $0 < \Phi_\pi - \Phi_u < \pi/2$. A partir des valeurs des amplitudes (σ_0, u_0) obtenues expérimentalement, on peut calculer le module d'élasticité en compression dynamique comme étant :

$$E = \frac{\varepsilon_0}{u_0} \cos(\Phi_\pi - \Phi_u) \quad (1.23)$$

où $\Phi_\pi - \Phi_u$ est le déphasage entre la réponse en pression et la déformation imposée.

La figure 26 présente un cas type de courbe de réponse en pression de surface du surfactant pulmonaire pour une sollicitation dynamique d'amplitude $dA/A = 0.17$. On peut observer que la réponse en pression de surface est linéaire avec la même fréquence que la sollicitation imposée et aucun déphasage n'a été mesuré ce qui signifie que le surfactant pulmonaire a un comportement élastique pour la fréquence et l'amplitude de sollicitation imposées.

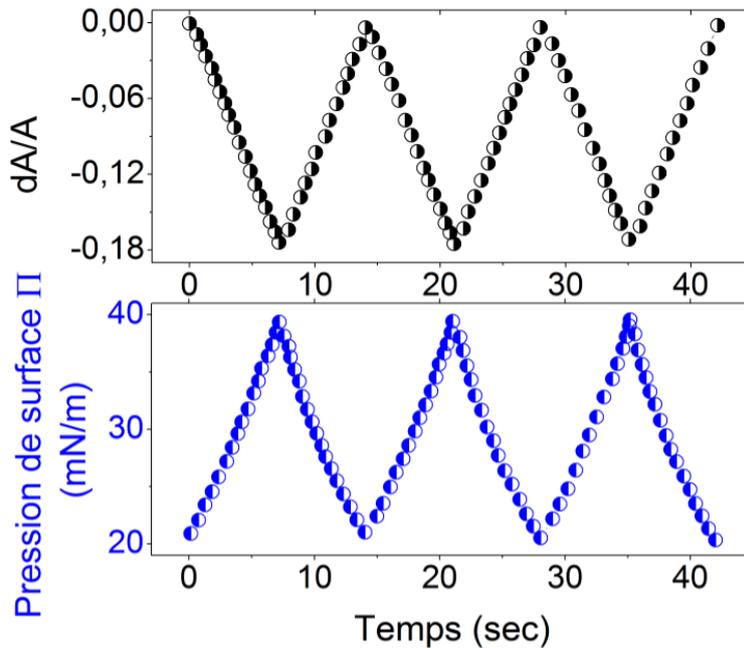


Fig. 26 La réponse de la pression de surface du surfactant pulmonaire à une sollicitation dynamique d'amplitude $dA/A = 0.17$.

La figure 27 présente la variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide en fonction de la fréquence de sollicitation (fréquence de respiration). On observe qu'à des faibles fréquences de sollicitations le module d'élasticité est assez faible, étant comparable avec le module d'élasticité de la phase expansée obtenu en compression lente. Le module d'élasticité augmente systématiquement avec la fréquence des sollicitations jusqu'à une valeur de saturation d'environ 120 mN/m. Ce type de comportement est dû à la présence des domaines condensés et au transport diffusif entre la phase fluide et les domaines condensés

comme il a été déjà montré dans d'autres études (Arriaga, et al., 2008) (Arriaga, et al., 2010) qui confirme nos résultats. Selon ces études, si le coefficient de diffusion est plus faible que la vitesse de déformation imposée, le surfactant pulmonaire emmagasine de l'énergie élastique ce qui conduit à une augmentation du module d'élasticité.

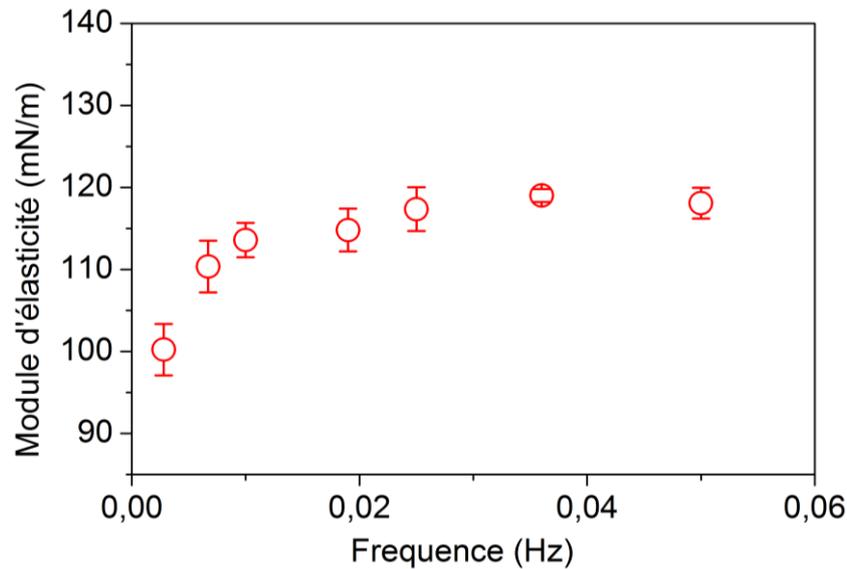


Fig. 27 Variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide en fonction de la fréquence de sollicitation (fréquence de respiration)

Un autre effet de ces phénomènes de transport diffusif entre la phase fluide et les domaines condensés est l'apparition de l'hystérésis compression-expansion.

D.3.4.3 Hystérésis respiratoire de compression-expansion

On observe que pendant la simulation des cycles respiratoires, la courbe de compression (expiration) et la courbe d'expansion (inspiration) ne coïncident pas. L'écart entre ces deux courbes porte le nom d'hystérésis (Fig. 28), qui a une très grande importance dans le processus respiratoire car il est lié aux phénomènes d'écoulement du surfactant pulmonaire à la surface de l'alvéole, impliqués dans l'élimination des particules (Gradon, et al., 2003), c'est-à-dire la capacité du surfactant pulmonaire de déplacer les particules vers les voies respiratoires supérieures où il y a le système muco-ciliaire. En effet, il a été déjà montré que l'aire de l'hystérésis mesurée sur du surfactant pulmonaire prélevé de poumons pathologiques (par exemple dans le cas du syndrome de détresse respiratoire) est inférieure à l'aire de l'hystérésis mesurée dans le cas d'un surfactant pulmonaire sain (Notter, et al., 1982), montrant ainsi que la diminution de l'aire de l'hystérésis signifie la diminution de l'efficacité du surfactant pulmonaire. Par conséquent l'aire de l'hystérésis est un paramètre supplémentaire indiquant l'efficacité du surfactant pulmonaire (Gradon, et al., 2003). Dans notre étude, nous avons calculé l'aire de l'hystérésis normalisée (Sosnowski, et al., 1999) qui représente l'aire de l'hystérésis de compression-expansion divisée par l'amplitude de déformation :

$$HA = \frac{[\int_{A_{min}}^{A_{max}} \Pi dA]_{expiration} - [\int_{A_{min}}^{A_{max}} \Pi dA]_{inspiration}}{A_{max} - A_{min}} \quad (1.24)$$

où Π est la pression de surface (en mN/m) et A est l'aire ($\text{nm}^2/\text{molécule}$)

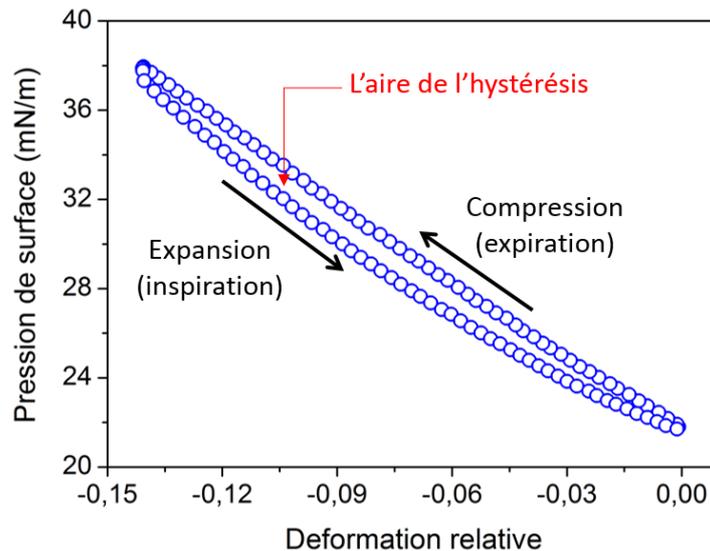


Fig. 28 Exemple de l'hystérésis respiratoire mesuré pendant la simulation des cycles respiratoires

D.3.5 Rôle des protéines

Rappelons que le surfactant pulmonaire est constitué de 90% des phospholipides et 10 % des protéines et que c'est dans ce contexte que nous avons étudié le rôle des protéines dans l'efficacité du surfactant pulmonaire. Cela permettra d'améliorer notre modèle de surfactant pulmonaire. En effet, la Protéine Surfactant B (SP-B) est déjà connue pour jouer un rôle important dans la formation est le comportement mécanique du surfactant pulmonaire pendant la respiration (Weaver, et al., 2001) en stabilisant les structures lipidiques à l'interface air-liquide. L'absence congénitale de cette protéine génère des maladies comme le syndrome de détresse respiratoire⁵⁴ qui est une maladie létale pour le nouveau-né (Clark, et al., 1995) (Nogee, et al., 1994). Depuis la première démonstration de l'importance du SP-B dans l'efficacité du surfactant pulmonaire, les recherches ont essayé de l'utiliser *ex vivo* dans la thérapie de traitement de ces maladies. Deux méthodes d'obtention de cette protéine sont pratiquées :

1. La purification à partir des lavages broncho-pulmonaire - actuellement plusieurs substituts de surfactant pulmonaire contenant des protéines purifiées à partir du lavage broncho-pulmonaire sont disponibles sur le marché : AlveofactTM, SurvantaTM, InfasurfTM, CurosurfTM. Cette méthode a des inconvénients comme par exemple la pureté insuffisante ou le risque de transmission des certaines maladies (Moya, et al., 2007)

2. La synthèse chimique – qui serait une alternative à la purification du SP-B à partir du lavage broncho-pulmonaire animal (Baatz, et al., 2001). L'inconvénient de cette méthode provient de l'impossibilité de synthétiser des protéines contenant un grand nombre d'acides aminés (unités répétitives). Pour cette raison des analogues sont utilisés, c'est-à-dire des protéines d'une taille inférieure mais qui contiennent les mêmes groupements fonctionnels que la protéine native.

⁵⁴ Est un état critique (extrêmement grave) où la compliance pulmonaire et la capacité d'échanges gazeux chutent radicalement. Son traitement, à la fois étiologique et symptomatique, ne permet une survie que dans la moitié des cas. Son pronostic reste donc encore très sombre et il peut laisser des séquelles importantes.

Dans cette étude nous avons utilisé un analogue de la protéine SP-B, appelé KL₄, constitué de 21 aminoacides et obtenue par synthèse chimique. Cette protéine est déjà un composant de base dans le substitut de surfactant pulmonaire Surfaxin (Lucinactant)⁵⁵ (Cochrane, et al., 1996) (Holten-Andersen, et al., 2011).

Cette protéine a été obtenue par synthèse sous forme de poudre par Biomatik (Biomatik Corporation, Canada) en utilisant un synthétiseur automatique basé sur la technique Fmoc⁵⁶ et sa pureté a été vérifiée par HPLC⁵⁷. Elle contient des unités répétitives de 5 aminoacides qui respectent le rapport unités cationiques/unités hydrophobes de la protéine native SP-B, ce qui lui confère des propriétés de stabilisation des structures lipidiques à l'interface air-liquide. La poudre a été dissoute dans du méthanol puis la solution obtenue a été mélangée avec la solution lipidique, utilisée par la suite pour obtenir le surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide de la cuve de Langmuir. Le surfactant pulmonaire contenant la protéine ainsi obtenu a été soumis à des sollicitations harmoniques de compression-expansion simulant les cycles respiratoires à l'aide des deux barrières mobiles. La pression de surface a été continuellement enregistrée et le module d'élasticité a été calculé en utilisant l'équation (1.23) comme décrit précédemment. La figure 29 met en évidence la variation du module d'élasticité en fonction de la fréquence de sollicitations et pour deux concentrations différentes de la protéine KL₄ dans le surfactant pulmonaire. On a utilisé un surfactant pulmonaire contenant 90% lipides et 10% KL₄ (*surfactant pulmonaire + 10 % KL₄*) pour simuler les conditions *in vivo*⁵⁸ et un surfactant pulmonaire contenant 94% lipides et 6% KL₄ (*surfactant pulmonaire + 6 % KL₄*) pour comparaison. Pour les deux concentrations différentes de protéines dans le surfactant pulmonaire on a observé le même comportement du module d'élasticité conforme au surfactant pulmonaire seul, c'est-à-dire une légère augmentation avec la fréquence de sollicitation et la stabilisation à des fréquences supérieures. En plus, une augmentation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire est observée avec l'augmentation de la quantité des protéines. Cela peut être dû à une forte interaction entre la protéine et les lipides qui font que la protéine s'insère dans la monocouche lipidique. On observe également une augmentation de l'aire de l'hystérésis en présence des protéines ce qui se traduit par une augmentation de l'efficacité du surfactant pulmonaire. D'ailleurs, a été déjà proposé par d'autres auteurs que la protéine KL₄ interagit fortement et sélectivement avec les lipides anioniques de la structure du surfactant pulmonaire (Pérez-Gil, et al., 1995) (Takamoto, et al., 2001), ce qui explique nos résultats.

⁵⁵ Unités de base des protéines

⁵⁶ Technique de synthèse en phase solide des protéines

⁵⁷ Chromatographie en phase liquide à haute performance

⁵⁸ On a utilisé une concentration de KL₄ identique à la concentration physiologique de protéines dans le surfactant pulmonaire qui est de 10 %

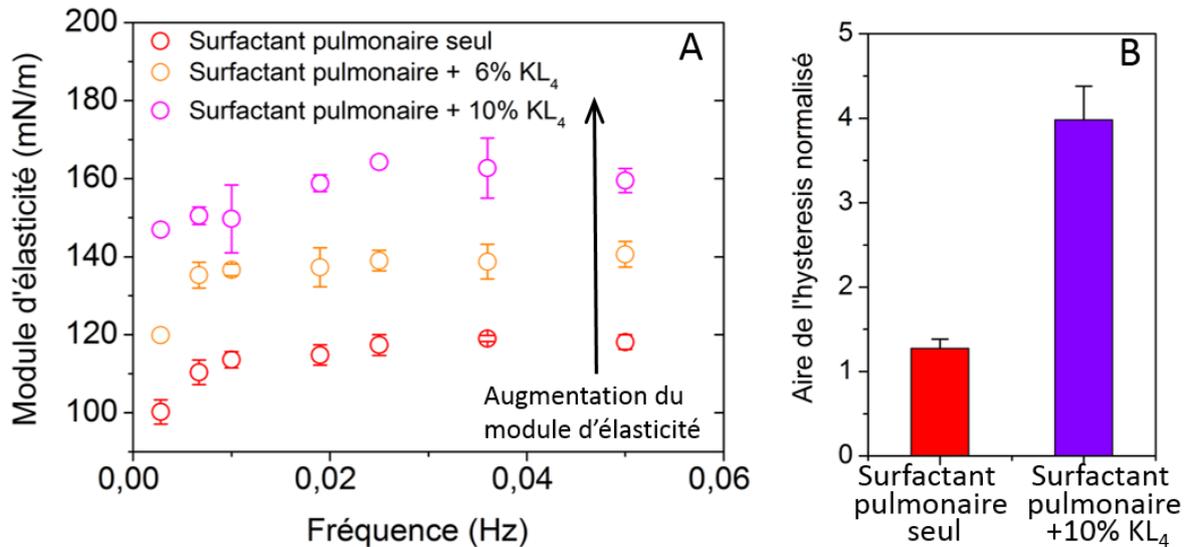


Fig. 29 A : Variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide en fonction de la fréquence de sollicitation (fréquence de respiration) pour différentes quantités des protéines (KL₄) dans la composition du surfactant pulmonaire.
 B : Valeurs moyennes de l'aire de l'hystérésis du surfactant pulmonaire sans et avec la protéine KL₄

Pour mieux comprendre l'évolution du comportement mécanique induit par l'ajout de la protéine KL₄, une visualisation de la microstructure du surfactant pulmonaire est nécessaire.

A cause de la présence des protéines dans la structure du surfactant pulmonaire, la visualisation par la Microscopie d'Angle de Brewster n'est pas possible. Par conséquent, le surfactant pulmonaire contenant les protéines a été transféré en monocouche sur des substrats de mica par la méthode de Langmuir-Blodgett. Cela permet la visualisation de sa structure par la microscopie de fluorescence. Les images de fluorescence obtenue indiquent, comme dans le cas du surfactant pulmonaire seul, la présence des domaines condensés noirs. Ces domaines condensés occupent une surface totale plus grande par rapport à celle obtenu pour le surfactant pulmonaire sans protéine (Fig.30D) ce qui peut expliquer l'augmentation de son module d'élasticité. On observe également que ces domaines interagissent entre eux, un effet due à la présence de la protéine, car n'a pas été observé pour le surfactant pulmonaire seul.

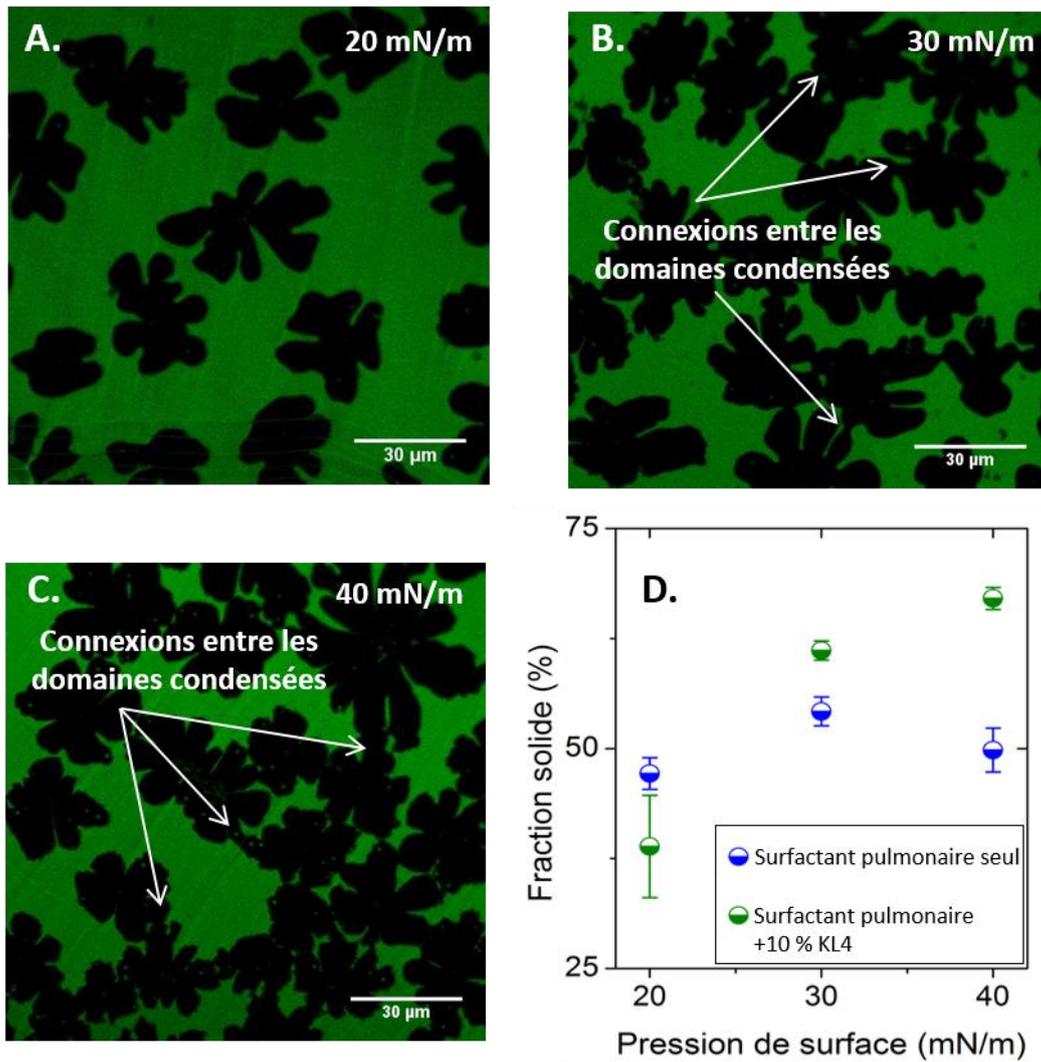


Fig. 30 Images de fluorescence du surfactant pulmonaire contenant 10 % de KL4 et transféré sur des substrats solides de mica à des pressions de surface différentes : 20 mN/m (A), 30 mN/m (B), 40 mN/m (C). Evolution de la fraction solide pour le surfactant pulmonaire sans et avec la protéine KL4.

Pour confirmer que la protéine KL₄ favorise l'interaction entre les domaines, la structure des bicouches de surfactant pulmonaire contenant 10 % de protéines KL₄ transférées sur des substrats de mica a été analysée par microscopie de force atomique. Pour éviter des éventuels changements dans la structure de la protéine à cause du contact avec l'air, nous avons choisi des bicouches qui sont complètement immergées dans une solution tampon simulant le milieu biologique. Sur les images obtenues (Fig.31) on observe la présence des protéines KL₄ (ou agglomérations de celles-ci) au bord des domaines condensés.

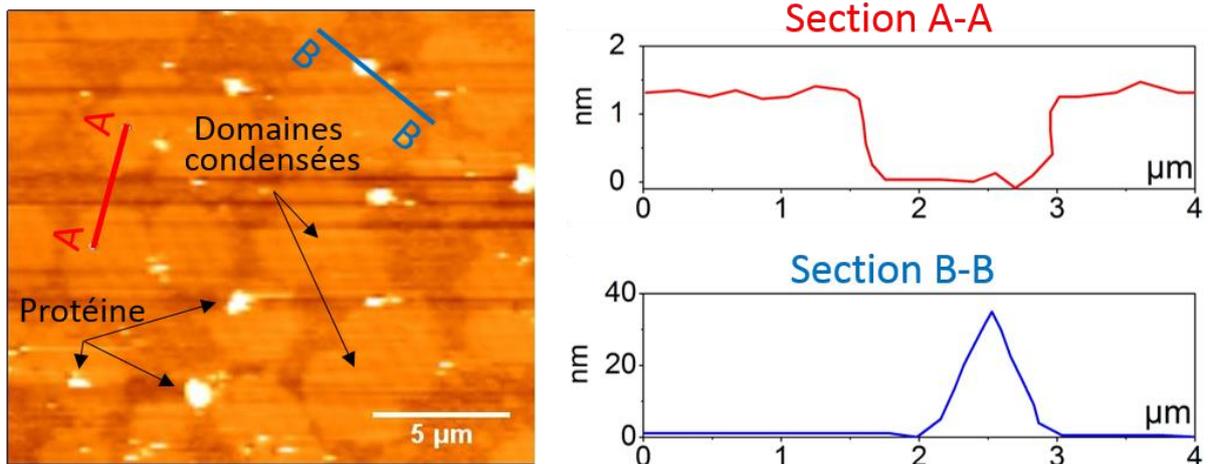


Fig. 31 Image de microscopie de force atomique en milieu liquide d'une bicouche de surfactant pulmonaire contenant 10 % de KL4 et transféré sur des substrats solides de mica à une pressions de surface de 40mN/m

Dans certains cas, des connexions entre les domaines condensés par l'intermédiaire de la protéine sont aussi observables. Cela confirme le rôle des protéines KL₄ dans l'interaction des domaines condensés qui pourrait être une explication de l'augmentation du module d'élasticité et de l'aire de l'hystérésis du surfactant pulmonaire avec l'ajout des protéines KL₄.

Comme l'utilisation de cette protéine rend impossible la visualisation par BAM une étude comparative de l'action des particules modèles sur les propriétés mécaniques du film de surfactant avec et sans protéine a été réalisée. Les résultats, présentés dans l'annexe 7, montrent que l'action des particules est semblable sur un surfactant contenant ou non des protéines. C'est pour cela que par la suite nous avons choisi de reproduire seulement la phase lipidique qui semble la plus importante dans l'interaction directe surfactant / particules.

D.4 Conclusions préliminaires

Le modèle de surfactant pulmonaire mis au point dans ce chapitre est un modèle expérimental «simple», mais suffisant pour reproduire le comportement mécanique de l'interface air/liquide de la surface de l'alvéole pulmonaire. De plus, ce modèle présente l'avantage de :

- permettre la simulation des cycles respiratoires à des fréquences contrôlées,
- permettre la visualisation de la microstructure du surfactant pulmonaire à une échelle de quelques dizaines de μm en utilisant la microscopie d'angle de Brewster, jusqu'à une échelle de quelques μm en utilisant la microscopie de fluorescence, pour atteindre des échelles nanométriques avec la microscopie de force atomique,
- respecter la composition *in vivo* du surfactant pulmonaire contenant tous les types de lipides : lipides en phase solide, lipides anioniques et lipides en phase fluide, sous forme des couches moléculaire uniques (monocouche de lipides de 2.5 nm épaisseur) à la surface d'un liquide qui simule le milieu biologique et la sous-phase aqueuse.

Les résultats présentés montrent que ce modèle de surfactant pulmonaire diminue la tension de surface de la sous-phase en créant des forces de répulsion latérale qui s'opposent à la diminution de surface. Il a donc une compressibilité faible et un module d'élasticité relativement élevé. Cette caractéristique lui confère la capacité de s'opposer à la diminution du volume des alvéoles pulmonaires en augmentant ainsi la capacité respiratoire.

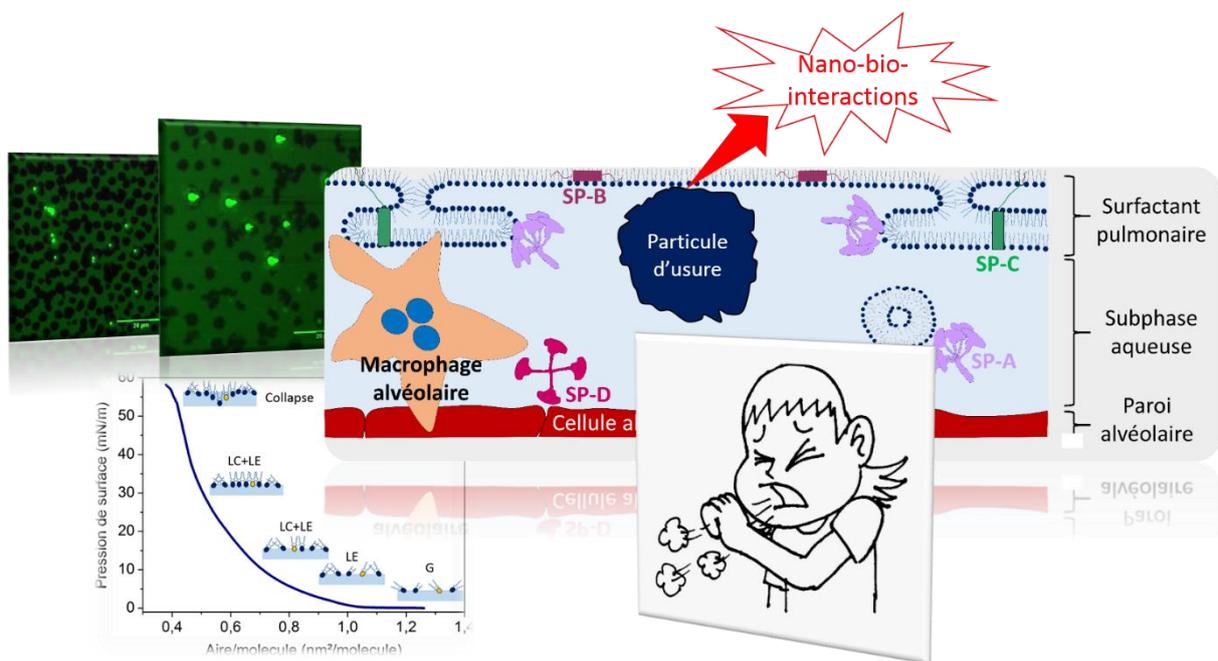
En conclusion, les résultats de ce chapitre valident notre modèle expérimental *ex vivo*. En conséquence, il est logique de poursuivre, dans le chapitre E, l'étude de l'interaction entre ce modèle expérimental et les particules modèles présentées précédemment.

Travaux cités

- Arriaga L R [et al.]** Domain-Growth Kinetic Origin of Nonhorizontal Phase Coexistence Plateaux in Langmuir Monolayers: Compression Rigidity of a Raft-Like Lipid Distribution [Revue] // *J. Phys. Chem. B*. - 2010. - Vol. 114. - pp. 4509–4520.
- Arriaga L R [et al.]** Nonlinear dilational mechanics of Langmuir lipid monolayers: A lateral diffusion mechanism [Revue] // *PHYSICAL REVIEW E*. - 2008. - Vol. 77. - p. 061918.
- Baatz J E [et al.]** High-yield purification of lung surfactant proteins sp-b and sp-c and the effects on surface activity. [Revue] // *Protein Expr Purif.* - 2001. - 1 : Vol. 23. - pp. 180-90.
- Bandorowicz-Pikula J, Sikorski A F et Bialkowska K** Interaction of annexins IV and VI with phosphatidylserine in the presence of Ca²⁺: monolayer and proteolytic study. [Revue] // *Mol Membr Biol.* - 1996. - 4 : Vol. 13. - pp. 241-250.
- Behroozi F** Theory of Elasticity in Two Dimensions and Its Application to Langmuir–Blodgett Films [Revue] // *Langmuir*. - 1996. - 9 : Vol. 12. - pp. 2289–2291.
- Clark J C [et al.]** Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice [Revue] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1995. - Vol. 92. - pp. 7794–7798.
- Cochrane C G [et al.]** The efficacy and safety of KL4-surfactant in preterm infants with respiratory distress syndrome. [Revue] // *Am J Respir Crit Care Med*. - 1996. - 1 : Vol. 153. - pp. 404-410.
- Farnoud A M et Fiegel J** Low concentrations of negatively charged sub-micron particles alter the microstructure of DPPC at the air-water interface [Revue] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. - 2012. - Vol. 415. - pp. 320-327.
- Gaines G L** Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces [Ouvrage]. - [s.l.] : Interscience, 1966.
- Goerke J** Lung surfactant [Revue] // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1974. - Vol. 344. - pp. 241-261.
- Gradon L et Marijnissen J C** Optimization of Aerosol Drug Delivery [Ouvrage]. - [s.l.] : Kluwer Academic Publishers, 2003.
- Guzmán E [et al.]** Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Nanoparticles on the Surface Pressure Response of DPPC Monolayers [Revue] // *J. Phys. Chem. C*. - 2011. - 44 : Vol. 115. - pp. 21715–21722.
- Harb F et Tinland B** Effect of Ionic Strength on Dynamics of Supported Phosphatidylcholine Lipid Bilayer Revealed by FRAPP and Langmuir–Blodgett Transfer Ratios [Revue] // *Langmuir*. - 2013. - Vol. 29. - p. 5540–5546.
- Harb F** These: Etude d'un système biomimétique simple: diffusion brownienne et mobilité électrophoretique d'une protéine membranaire modèle insérée dans une bicouche lipidique supportée [Rapport] / Université Aix-Marseille. - 2012.
- Harishchandra R K, Saleem M et Galla H J** Nanoparticle interaction with model lung surfactant monolayers [Revue] // *J R Soc Interface*. - 2010. - Suppl 1 : Vol. 7. - pp. S15–S26.
- Harper W R** How do solid surfaces become charged? Static Electrification Conference [Conférence]. - [s.l.] : Institute of Physics, 1967. - p. 3.
- Hendricks C D** Charging macroscopic particles [Ouvrage]. - New York : Wiley, 1972. - Vol. Electrostatics and Its Applications.
- Hilles H [et al.]** Fourier-transform rheology of polymer Langmuir monolayers: analysis of the non-linear and plastic behaviors [Revue] // *Adv Colloid Interface Sci.* - 2006. - Vol. 25. - pp. 67-77.
- Holten-Andersen N [et al.]** KL4 Peptide Induces Reversible Collapse Structures on Multiple Length Scales in Model Lung Surfactant [Revue] // *Biophysical Journal*. - 2011. - 12 : Vol. 101. - pp. 2957–2965.

- Krüger P [et al.]** Effect of Hydrophobic Surfactant Peptides SP-B and SP-C on Binary Phospholipid Monolayers. I. Fluorescence and Dark-Field Microscopy [Revue] // *Biophysical Journal*. - 1999. - Vol. 77. - pp. 903-9014.
- Lopez-Montero I [et al.]** Active membrane viscoelasticity by the bacterial FtsZ-Division Protein [Revue] // *Langmuir*. - 2012. - Vol. 28. - pp. 4744-4753.
- Mirea D A [et al.]** Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of synovial fluid [Revue] // *Tribology International*. - Vol. 59. - pp. 302-311.
- Monroy F, Ortega F et Rubio R** Dilatational rheology of insoluble polymer monolayers: Poly(vinylacetate) [Revue] // *PHYSICAL REVIEW E*. - 1998. - Vol. 58. - pp. 7629-7641.
- Moya F et Maturana A** Animal-derived surfactants versus past and current synthetic surfactants: current status [Revue] // *Clin. Perinatol.* - 2007. - Vol. 34. - pp. 145–177.
- Nogee L M [et al.]** A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds [Revue] // *J. Clin. Invest.* - 1994. - Vol. 93. - pp. 1860–1863.
- Notter R H, Taubold R et Mavis R D** Hysteresis in saturated phospholipid film and its potential relevance for lung surfactant function in vivo [Revue] // *Experimental Lung Research*. - 1982. - Vol. 3. - pp. 109-127.
- Pérez-Gil J, Casals C et Marsh D** Interactions of hydrophobic lung surfactant proteins SP-B and SP-C with dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers studied by electron spin resonance spectroscopy [Revue] // *Biochemistry*. - 1995. - 12 : Vol. 34. - pp. 3964-3971..
- Putz G [et al.]** Evaluation of pressure-driven captive bubble surfactometer [Revue] // *Journal of Applied Physiology*. - 1994. - Vol. 76. - pp. 1417-1424.
- Rosengarth A [et al.]** Ca²⁺-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers [Revue] // *FEBS Letters*. - 1998. - Vol. 438. - pp. 279-284.
- SAINT-MARTIN E** These: Etude de la rigidité de courbure de monocouches de Langmuir en présence d'un peptide antimicrobien [Rapport] / UNIVERSITÉ GRENOBLE I - JOSEPH FOURIER. - 2007.
- SCOMPARIN C** These: Dynamique des bicouches lipidiques supportées [Rapport] / Univeristé d'Aix-Marseille. - 2008.
- Sosnowski T R et Podgorski A** Assessment of the Pulmonary Toxicity of Inhaled Gases and Particles With Physicochemical Methods [Revue] // *INTERNATIONAL JOURNAL OF OCCUPATIONAL SAFETY AND ERGONOMICS* . - 1999. - 3 : Vol. 5. - pp. 431-447.
- Takamoto D Y [et al.]** Interaction of lung surfactant proteins with anionic phospholipids [Revue] // *Biophys J*. - 2001. - 1 : Vol. 81. - pp. 153-169..
- Vincent J H** INDUSTRIAL HYGIENE IMPLICATIONS OF THE STATIC ELECTRIFICATION OF WORKPLACE AEROSOLS [Revue] // *Journal Electrostatics*. - 1986. - Vol. 18. - pp. 113-145.
- Weaver T et Konkright J J** Function of surfactant proteins B and C [Revue] // *Annu. Rev. Physiol.* - 2001. - Vol. 63. - pp. 555–578.
- Wiki** Wikipedia- the free encyclopedia [En ligne]. - 2014. - 11 2014. - http://fr.wikipedia.org/wiki/Potentiel_z%C3%AAAta.
- Wiki** Wikipedia. The free Enciclopedia [En ligne] // http://en.wikipedia.org/wiki/Lam%C3%A9_parameters. - 2014. - Septembre 2014.
- Zeiss Carl** Education in Microscopy and Digital Imaging [En ligne] // *Zeiss: We make it visible*. - 2014. - 08 2014. - <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/livecellimaging/techniques.html>.

ETUDE DE L'INTERACTION AVEC LES PARTICULES : EXPLOITATION DU MODELE



Chapitre E

Cette thèse vise d'analyser les mécanismes d'interaction des particules aéroportées avec le surfactant pulmonaire afin d'identifier la relation entre les propriétés physico-chimiques des particules et leur effets sur le fonctionnement normal du surfactant pulmonaire, c'est-à-dire leur « toxicité »

Dans ce contexte, ce chapitre est consacré à l'application du modèle du surfactant pulmonaire défini et validé dans le chapitre D dans l'étude de toxicité des particules modèle simulant les particules d'usure aéroportées en utilisant une approche multiechelle.

ETUDE DE L'INTERACTION AVEC LES PARTICULES : EXPLOITATION DU MODELE

Table des matières

E.1 Introduction.....	99
E.2 Changement des propriétés mécaniques.....	99
E.2.1 Particules positives vs particules négatives.....	99
E.2.1.1 Modifications du module d'élasticité du surfactant pulmonaire.....	100
E.2.1.2 Modifications de l'aire de l'hystérésis de compression-expansion du surfactant pulmonaire	102
E.2.2 Particules négatives vs particules « plus négatives ».....	103
E.2.2.1 Modifications du module d'élasticité du surfactant pulmonaire.....	104
E.2.2.1 Modifications de l'aire de l'hystérésis du surfactant pulmonaire.....	105
E.2.3 Conclusions préliminaires et hypothèses.....	106
E.3 Origine des changements des propriétés mécaniques : modification de la microstructure	107
E.3.1 Particules positives vs particules négatives.....	109
E.3.2 Particules négatives vs particules « plus négatives »	113
E.3.3 Conclusions préliminaires.....	116
E.3.4 Confirmation des hypothèses : modélisation dynamique moléculaire.....	118
E.4 Origine des changements de la microstructure : interaction avec les particules	123
E.4.1 Adhésion et adsorption des particules sur le surfactant pulmonaire : Condensation et nucléation des lipides.....	124
E.5 Conclusions préliminaires.....	134
Travaux cités.....	136

E.1 Introduction

Ce chapitre est consacré à l'application du modèle de surfactant pulmonaire défini et validé dans le chapitre antérieur portant sur l'étude de toxicité des particules d'usure aéroportées. On rappelle qu'en raison de la grande complexité et de la variabilité des particules d'usure aéroportées dans l'environnement (voir chapitre A), il est très difficile d'identifier les grandeurs et les paramètres des particules qui gouvernent leurs interactions avec le surfactant pulmonaire et qui déterminent ainsi leur toxicité. Par conséquent, dans un premier temps, l'utilisation des particules modèles avec des paramètres bien définis et connus en termes de taille, forme, chimie de surface est vraiment nécessaire pour identifier et comprendre les interactions avec le surfactant pulmonaire et leurs effets sur son efficacité, c'est-à-dire de comprendre leur toxicité. Rappelons que l'efficacité du surfactant pulmonaire, c'est-à-dire sa capacité de s'opposer à la diminution de volume de l'alvéole pulmonaire est donné par le **module d'élasticité** du surfactant pulmonaire pendant les cycles respiratoires. Plus le module d'élasticité est élevée plus l'efficacité du surfactant pulmonaire est élevée. Un autre paramètre lié à l'efficacité du surfactant pulmonaire pendant les cycles respiratoire est l'**aire de l'hystérésis** pression de surface/aire qui est élevé pour un surfactant pulmonaire efficient tandis qu'elle est faible dans le cas de maladies pulmonaires. On va donc présenter par la suite les modifications de module d'élasticité du surfactant pulmonaire quand il interagit avec différentes particules modèle. Ces résultats vont être corrélés avec les changements de l'aire de l'hystérésis. Les résultats présentés par la suite sont issus des deux types des essais qui mettent en évidence l'effet de :

- la charge de surface des particules - deux types de particules seront testés (particules positives vs particules négatives),
- l'électronégativité des particules (quantifié par le potentiel zêta) - deux types des particules avec des charges de surface différentes vont être testées (particules négatives vs particules «plus négatives»).

E.2 Changement des propriétés mécaniques

Nous avons utilisé le modèle *ex vivo* du surfactant pulmonaire (SP) pour étudier les effets des particules modèles sur les propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire (module d'élasticité et aire de l'hystérésis) pendant les cycles respiratoires.

E.2.1 Particules positives vs particules négatives

Dans un premier type d'essai, deux types de particules modèle ont été testés afin d'identifier l'effet de la charge de surface des particules sur le module d'élasticité et l'aire de l'hystérésis du surfactant pulmonaire:

- particules négatives⁵⁹ de polystyrène (PSC), avec un diamètre moyen d'environ 200 nm, contenant des groupements de surface carboxyle (-COO⁻).
- particules positives⁶⁰ de polystyrène avec un diamètre d'environ 200 nm, contenant des groupements de surface amidine (C(=NH)NH₂). Ces particules seront appelées par la suite **PSA**.

⁵⁹Potentiel zêta : $\delta = -19,1 \pm 10,9$ mV

⁶⁰ Potentiel zêta : $\delta = 33,1 \pm 5,91$ mV

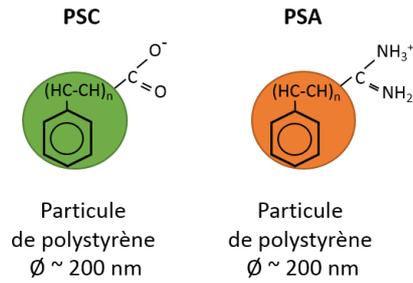


Fig. 1 Les particules modèles étudiées dans la première étape. PSC : Polystyrène carboxylé (négative), PSA : Polystyrène amidine (positive)

Le module d'élasticité et l'aire de l'hystérésis du surfactant pulmonaire ont été calculés en utilisant la démarche décrite dans le chapitre D pour des fréquences de sollicitations (fréquences des cycles respiratoires) comprises entre 0.0028 et 0.05 Hz. La sous-phase du surfactant pulmonaire est constituée d'une solution 0.015 M de Tris tamponné à pH = 7.4 et 0.15 M NaCl simulant le milieu biologique dans laquelle différentes quantités des particules positives ou négatives ont été dispersées. Il faut également mentionner que la tension de surface due à la dispersion des particules est comparable avec la tension de surface de la solution tampon seule, donc l'ajout des particules ne changent pas les conditions expérimentales.

E.2.1.1 Modifications du module d'élasticité du surfactant pulmonaire

Les résultats de la variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire (SP) en fonction de la fréquence de sollicitation et pour différentes quantités (mg/ml) de particules positives sont présentés sur la figure 2. On note que, pour toutes les quantités de particules étudiées le comportement avec la fréquence de sollicitation suit la même forme. De plus, aucune modification significative du module d'élasticité, ni avec l'ajout des particules, ni avec l'augmentation de la quantité des particules dans la sous-phase n'a été observée.

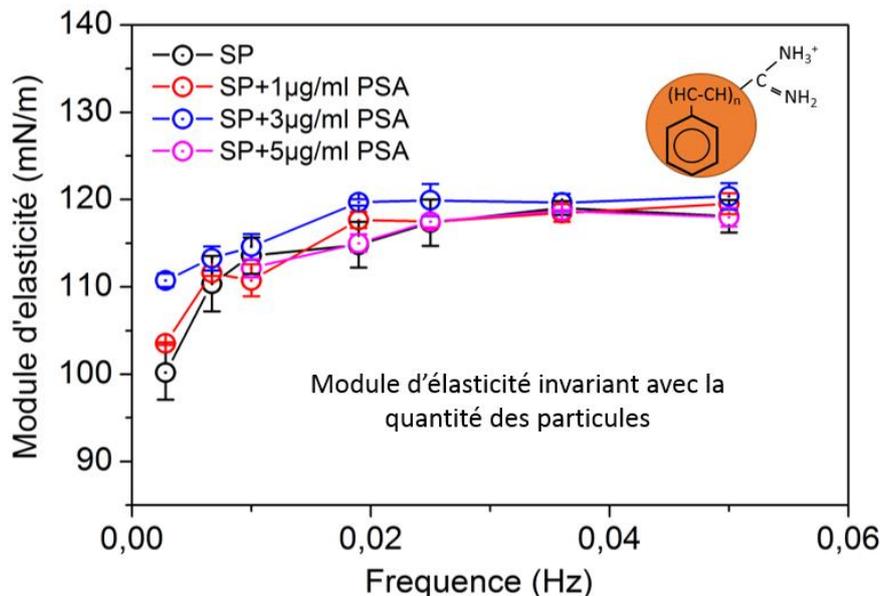


Fig. 2 Variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire (SP) à l'interface air-liquide en fonction de la fréquence de sollicitation (fréquence de respiration) pour différentes quantités de particules positives (PSA) dans la sous-phase

En revanche, quand des particules négatives sont présentes dans la sous-phase du surfactant pulmonaire, la diminution significative du module d'élasticité, même pour de faibles quantités de particules, est observée. De plus, cette diminution est directement proportionnelle avec la quantité des particules négatives dans la sous-phase ce qui indique de potentiels effets nocifs (« toxicité ») plus importants des particules négatives par rapport aux particules positives.

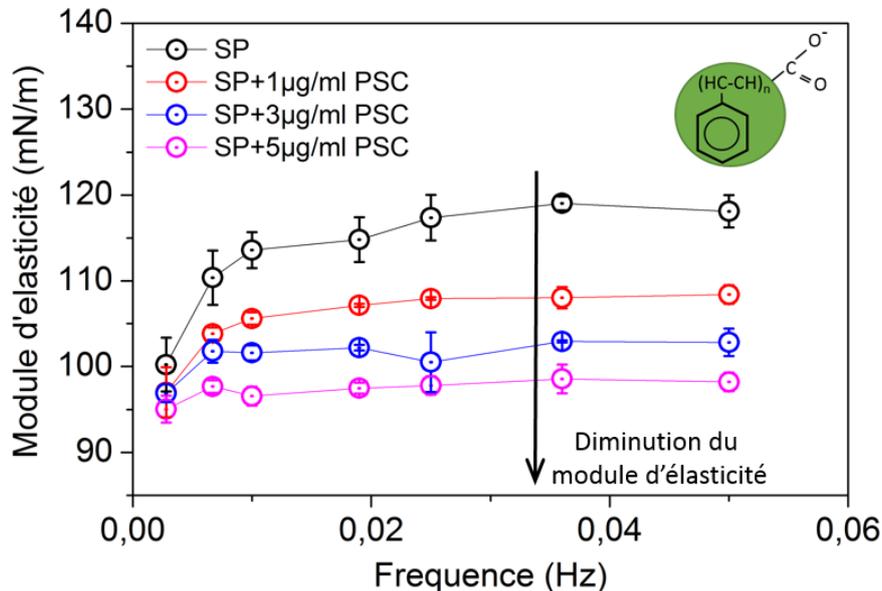


Fig. 3 Variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire (SP) à l'interface air-liquide en fonction de la fréquence de sollicitation (fréquence de respiration) pour différentes quantités de particules négatives (PSC) dans la sous-phase

Pour une vue plus claire de cette différence, par la suite, on comparera l'évolution du module d'élasticité du surfactant pulmonaire en fonction de la quantité de particules pour une fréquence de référence de 0.01 Hz suffisamment faible pour minimiser les mouvements oscillatoires (« vagues ») à la surface de la cuve de Langmuir. Ainsi, sur la figure 4 on peut observer l'évolution du module d'élasticité en fonction de la quantité des particules positives (PSA) et négatives (PSC) dans la sous-phase.

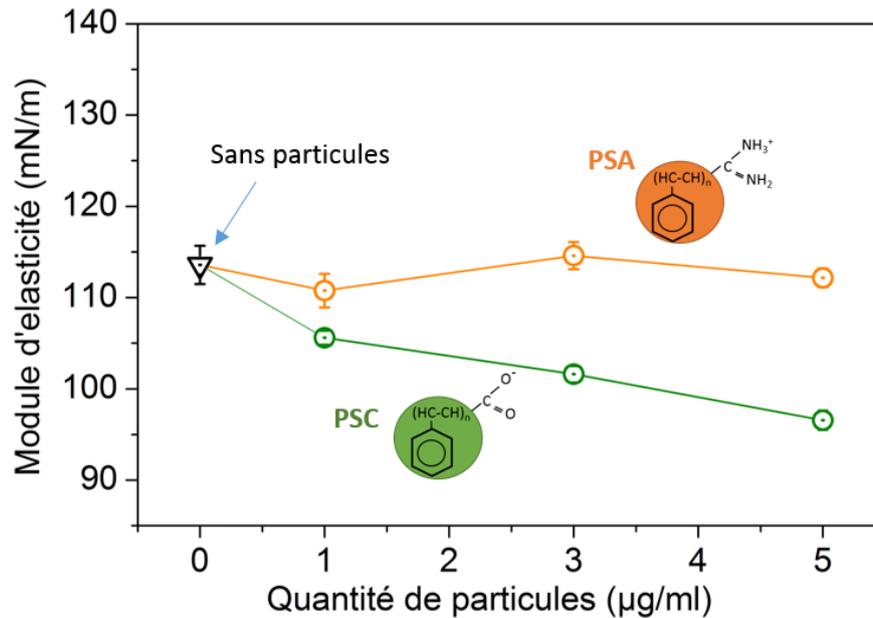


Fig. 4 Les valeurs moyennes du module d'élasticité du surfactant pulmonaire (SP), en présence de particules positives (PSA) et négatives (PSC) pour une fréquence de sollicitation de 0.01 Hz

On note une claire différence entre les effets de ces deux particules sur le module d'élasticité du surfactant pulmonaire. Les particules positives n'ont pas d'effets significatifs sur le module d'élasticité du surfactant pulmonaire, tandis que les particules négatives le diminuent considérablement et cette diminution est liée à la quantité des particules.

E.2.1.2 Modifications de l'aire de l'hystérésis de compression-expansion du surfactant pulmonaire

Comme l'aire de l'hystérésis de compression-expansion du surfactant pulmonaire est indépendante de la fréquence des sollicitations, on présentera par la suite les valeurs uniquement pour la fréquence de 0.01 Hz. Afin de comparer les valeurs, on a calculé l'aire de l'hystérésis réduite qui est le rapport entre l'aire de l'hystérésis pour une concentration donnée de particules dans la sous-phase et l'aire de l'hystérésis sans particules. L'ensemble des valeurs moyennes de l'aire de l'hystérésis réduite pour le surfactant pulmonaire (SP), en présence des particules positives (PSA) et négatives (PSC) est regroupé dans la figure 5.

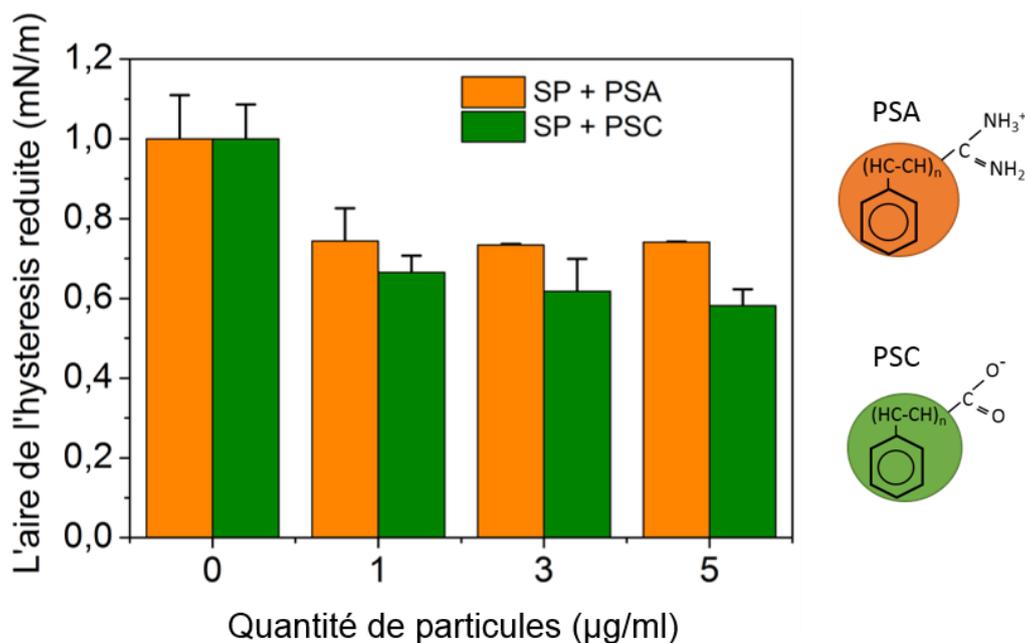


Fig. 5 Les valeurs moyennes de l'aire de l'hystérésis réduite pour le surfactant pulmonaire (SP), en présence de particules positives (PSA) et négatives (PSC) pour une fréquence de sollicitation de 0.01 Hz

On note que les deux types des particules, même à de faibles quantités dans la sous-phase diminuent l'aire de l'hystérésis. Cependant, pour les particules positives (PSA) on remarque qu'au-delà de la concentration de 1 µg/ml particules dans la sous-phase, l'aire de l'hystérésis reste constante, tandis que dans le cas des particules négatives (PSC) la diminution de l'aire est directement proportionnelle à la concentration. Ainsi, la diminution de l'aire de l'hystérésis et du module d'élasticité du surfactant pulmonaire par les particules négatives peuvent indiquer une perte de l'efficacité du surfactant pulmonaire qui peut entraîner des troubles respiratoires.

E.2.2 Particules négatives vs particules «plus négatives»

Tenant compte des résultats présentés précédemment, il est évident que les particules négatives ont des effets nocifs sur le surfactant pulmonaire (diminution du module d'élasticité et diminution de l'aire de l'hystérésis). Pour confirmer ces résultats et pour déterminer l'effet de l'électronégativité de ces particules, un deuxième type d'essai a été réalisé en utilisant :

- les mêmes particules négatives⁶¹ de polystyrène, avec un diamètre moyen d'environ 200 nm, contenant des groupements de surface carboxyle (-COO⁻). Ces particules seront appelées par la suite **PSC**,
- des particules « plus négatives »⁶² de polystyrène avec un diamètre moyen d'environ 200 nm, contenant des groupements de surface sulfate (-SO₃⁻). Ces particules seront appelées par la suite **PSS**.

⁶¹ Potentiel zêta : $\delta = -19,1 \pm 10,9$ mV

⁶² Potentiel zêta : $\delta = -33,6 \pm 15,7$ mV

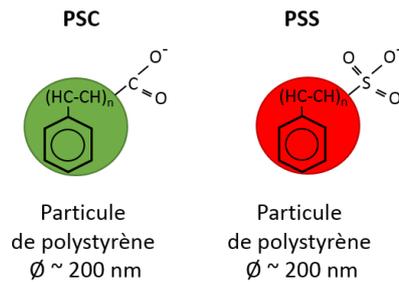


Fig. 6 Les particules modèles étudiées dans la deuxième étape. PSC : Polystyrène carboxylé (négative), PSS : Polystyrène sulfate (« plus négative »). Les particules PSS sont plus électronégatives que les particules PSC

En suivant la même logique, par la suite, les effets sur les propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire (module d'élasticité et aire de l'hystérésis) de ces deux types de particules seront présentés.

E.2.2.1 Modifications du module d'élasticité du surfactant pulmonaire

Sur la figure 7 les résultats de la variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire (SP) en fonction de la fréquence de sollicitation et pour différentes quantités des particules « plus négatives » (PSS) sont présentés. On constate, comme dans le cas des particules PSC, une diminution significative du module d'élasticité même pour de faibles quantités des particules PSS dans la sous-phase et cette diminution est dépendante de la concentration des particules comme on peut le voir plus clairement dans la figure 8 (courbe verte). Sur la même figure, qui compare l'effet des particules PSC et PSS sur le module d'élasticité du surfactant pulmonaire, on peut voir que les particules PSS (« plus négatives ») diminuent plus le module d'élasticité que les particules PSC, c'est-à-dire elles peuvent avoir des effets nocifs plus graves. Ces effets sont évidemment donnés par le type de groupement chimique sur la surface des particules, les groupements SO_3^- étant plus électronégatifs que les groupements COO^- .

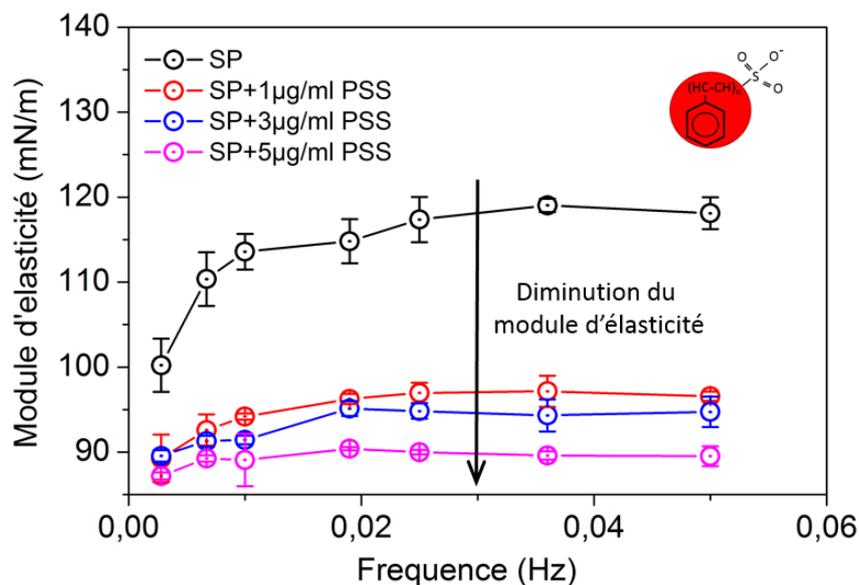


Fig. 7 Variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire (SP) à l'interface air-liquide en fonction de la fréquence de sollicitation (fréquence de respiration) pour différentes quantités de particules négatives (PSS) dans la sous-phase

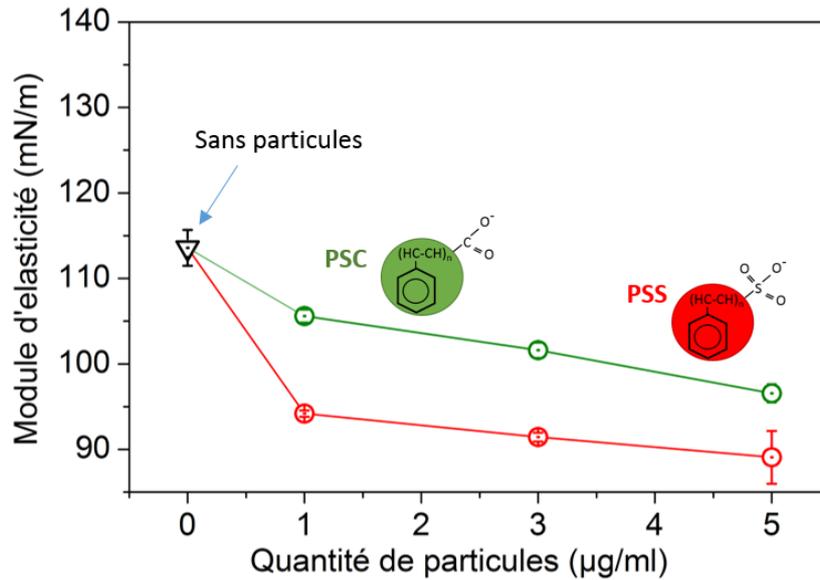


Fig. 8 Les valeurs moyennes du module d'élasticité du surfactant pulmonaire (SP), en présence de particules négatives (PSC) et « plus » négatives (PSS) pour une fréquence de sollicitation de 0.01 Hz

Les mesures du module d'élasticité du surfactant pulmonaire ont été corrélées avec les mesures d'aire de l'hystérésis qui seront présentées par la suite.

E.2.1.1 Modifications de l'aire de l'hystérésis du surfactant pulmonaire

Les particules PSS affectent aussi l'aire de l'hystérésis. L'ensemble des valeurs moyennes de l'aire de l'aire de l'hystérésis réduite pour le surfactant pulmonaire (SP), en présence des particules négatives (PSC) et « plus négatives » (PSS) est regroupé dans la figure 9. Comme dans le cas précédent on note que les deux types des particules, même pour de faibles quantités dans la sous-phase diminuent l'aire de l'hystérésis. Une légère différence est cependant observée entre ces deux types de particules, mais elle est située dans la barre d'erreur.

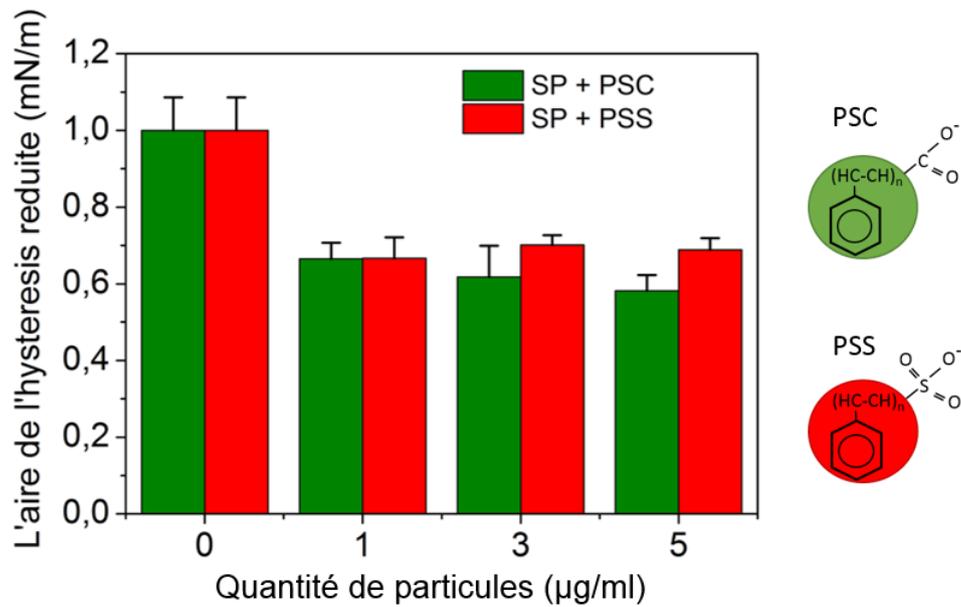


Fig. 9 Les valeurs moyennes de l'aire de l'hystérésis réduite pour le surfactant pulmonaire (SP), en présence des particules négatives (PSC) et « plus » négatives (PSS) pour une fréquence de sollicitation de 0.01 Hz

Dans les paragraphes suivants nous proposons quelques hypothèses pour expliquer les modifications des propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire.

E.2.3 Conclusions préliminaires et hypothèses

Les résultats obtenus et présentés dans ce paragraphe montrent que les particules négatives affectent les propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire d'une manière plus importante que les particules positives. En effet, les particules négatives diminuent le module d'élasticité du surfactant pulmonaire. Plus les particules sont négatives (quantifié par le potentiel zêta) plus leur interaction avec le surfactant pulmonaire diminue son module d'élasticité pendant les cycles respiratoires. Un autre effet de ces interactions est aussi la diminution de l'aire d'hystérésis. Comme le module d'élasticité donne la résistance à la compression et l'aire de l'hystérésis donne la capacité à éliminer les particules, leur diminution peut se traduire par une diminution d'efficacité du surfactant pulmonaire et par conséquent de la capacité respiratoire.

En revanche, l'interaction du surfactant pulmonaire avec les particules positives ne modifie pas son module d'élasticité et d'une manière moins évidente l'aire de l'hystérésis pendant les cycles respiratoires. Cela peut être interprété par un niveau de toxicité inférieur des particules positives par rapport aux particules négatives.

Pour mieux comprendre l'origine de ces modifications des propriétés mécaniques, nous avons suivi l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale en présence des particules étudiées.

E.3 Origine des changements des propriétés mécaniques : modification de la microstructure

Nous avons suivi l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale pour identifier l'origine de la diminution des propriétés mécaniques quand il interagit avec les particules négatives. Cela a été possible par la Microscopie d'Angle de Brewster (BAM), les résultats étant présentés dans les paragraphes suivants.

Pour le surfactant pulmonaire sans particules dans la sous-phase, on observe l'apparition des domaines condensés à une pression de surface d'environ 7 mN/m. Ces domaines augmentent en taille graduellement avec la pression de surface jusqu'à une taille d'environ 60 μm (Fig. 10) atteinte à une pression de surface d'environ 20 mN/m. A partir de cette pression de surface la taille des domaines reste constante et la compression de la monocouche de surfactant se fait par la compression de la phase fluide entre les domaines. Ce phénomène est visible en calculant la distance moyenne entre les domaines (Fig. 10) qui diminue au cours de la compression bien que la taille des domaines reste constante. Cela peut être expliqué par le fait que les domaines condensés sont plus rigides que la phase fluide.

Cette microstructure assure un module d'élasticité et une aire de l'hystérésis assez élevé, comme on a pu le voir dans la section précédente. Par la suite nous allons présenter la modification de cette microstructure du surfactant pulmonaire lors de la compression latérale quand différents types des particules sont présentes dans la sous-phase. Comme pour les particules positives (PSA) nous n'avons pas observé de changements de microstructure du surfactant pulmonaire avec la concentration, une seule concentration des particules sera présentée (3 $\mu\text{g/ml}$). En revanche, pour les particules négatives (PSC et PSS), deux concentrations différentes des particules (1 $\mu\text{g/ml}$ et 3 $\mu\text{g/ml}$) seront présentées, ce qui permettra d'une part d'étudier l'effet de la concentration des particules négatives sur la microstructure du surfactant pulmonaire et d'autre part la corrélation avec les mesures du module d'élasticité.

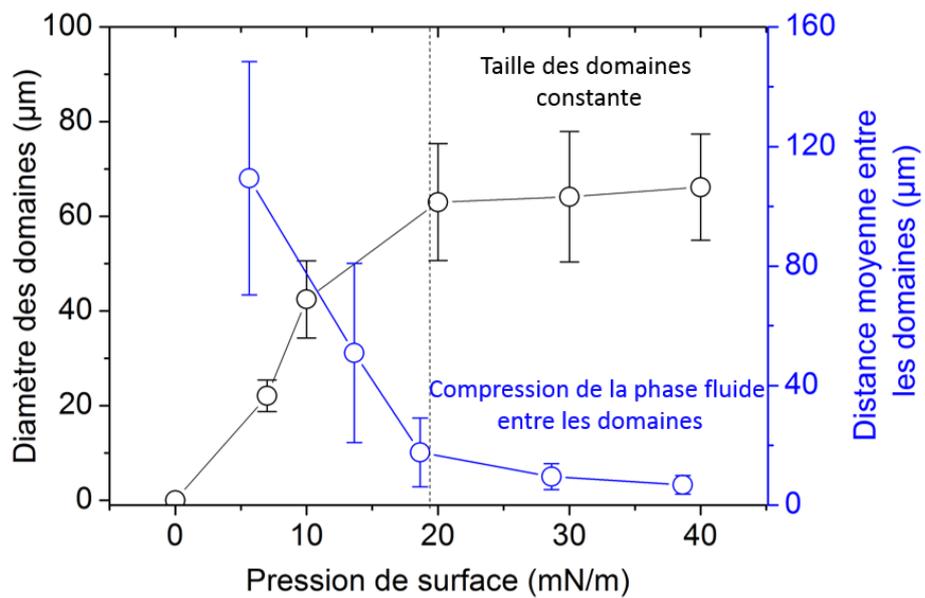
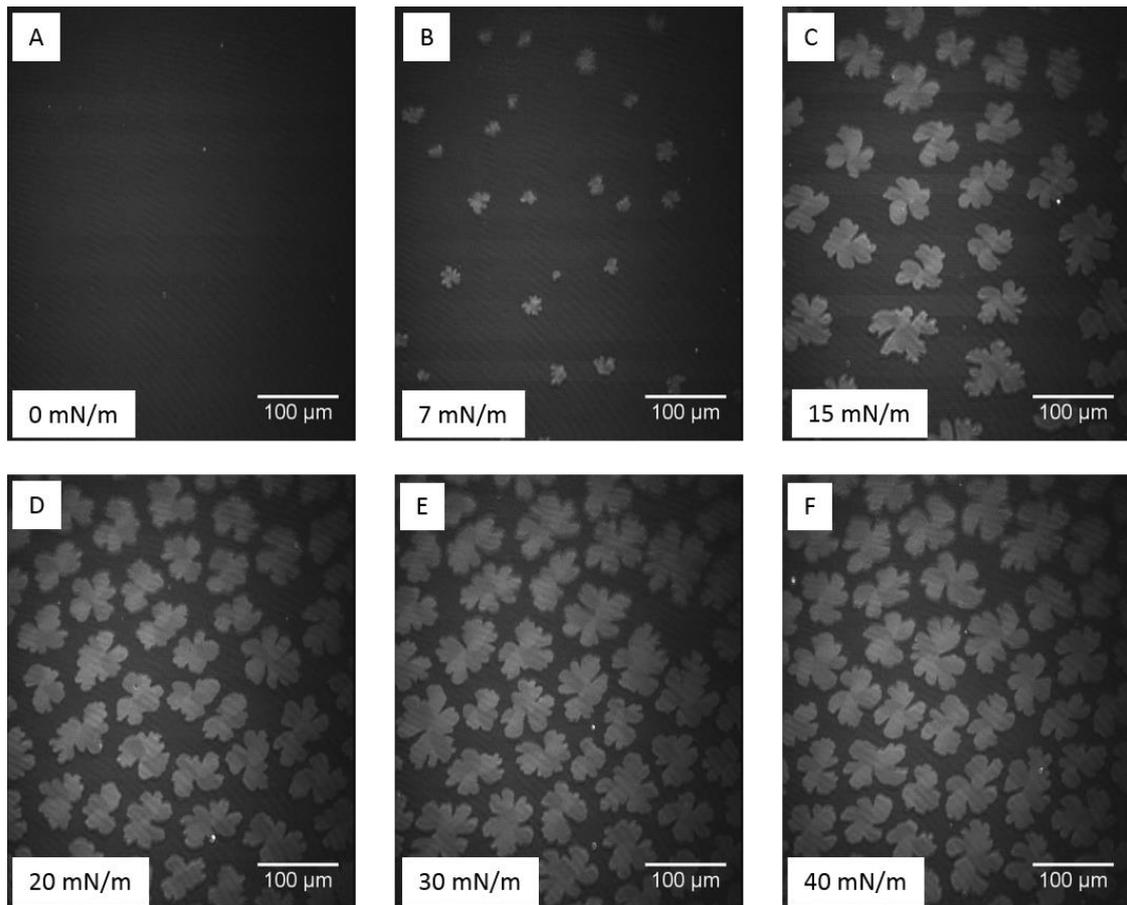


Fig. 10 Images BAM (A-F) montrant l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire *sans particules* à l'interface air-liquide pendant la compression latérale à une vitesse de $10 \text{ cm}^2/\text{s}$. Graphique montrant d'une part l'évolution du diamètre moyen des domaines condensés lors de la compression et d'autre part l'évolution de la distance moyenne entre ceux-ci

E.3.1 Particules positives vs particules négatives

La figure 11 montre l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale à une vitesse de $10 \text{ cm}^2/\text{s}$ contenant $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ particules positives (PSA) dans la sous-phase. Le graphique correspondant montre d'une part l'évolution du diamètre moyen des domaines condensés lors de la compression et d'autre part l'évolution de la distance moyenne entre celles-ci. Si on compare la microstructure du surfactant pulmonaire sans particules et la microstructure du surfactant pulmonaire en présence des particules positives (PSA), on observe que :

- le rapport entre l'aire occupé par les domaines condensés et l'aire totale du surfactant pulmonaire est d'environ 1:2 dans les deux cas, c'est-à-dire qu'approximativement 50% de la surface totale du surfactant pulmonaire est occupé par les domaines condensés,
- la taille des domaines condensés est légèrement plus petite quand les particules positives sont présentes dans la sous-phase par rapport à la taille des domaines condensés du surfactant pulmonaire sans particules. Cela signifie que, même s'il y a des interactions entre les particules positives et le surfactant pulmonaire, celles-ci ne sont pas suffisamment fortes pour induire des changements significatifs.

En revanche, quand des particules négatives (PSC) sont présentes dans la sous-phase, même à des concentrations relativement faibles ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) on observe une diminution de la taille des domaines condensés, couplée avec une augmentation de la densité de celles-ci (Fig. 12). En effet, on a une augmentation de la densité de nucléation des domaines qui induit la formation de domaines plus petits lors de la compression due à un nombre limité de molécules lipidiques en phase solide (qui peuvent former des domaines condensés) dans la structure du surfactant pulmonaire. La diminution de la taille des domaines du surfactant pulmonaire peut expliquer la diminution de son module d'élasticité.

Cet effet de diminution de la taille des domaines par l'augmentation de la densité de nucléation est beaucoup plus important à des concentrations des particules négatives plus grandes ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig.13), ce qui est en accord avec la diminution du module d'élasticité du surfactant pulmonaire.

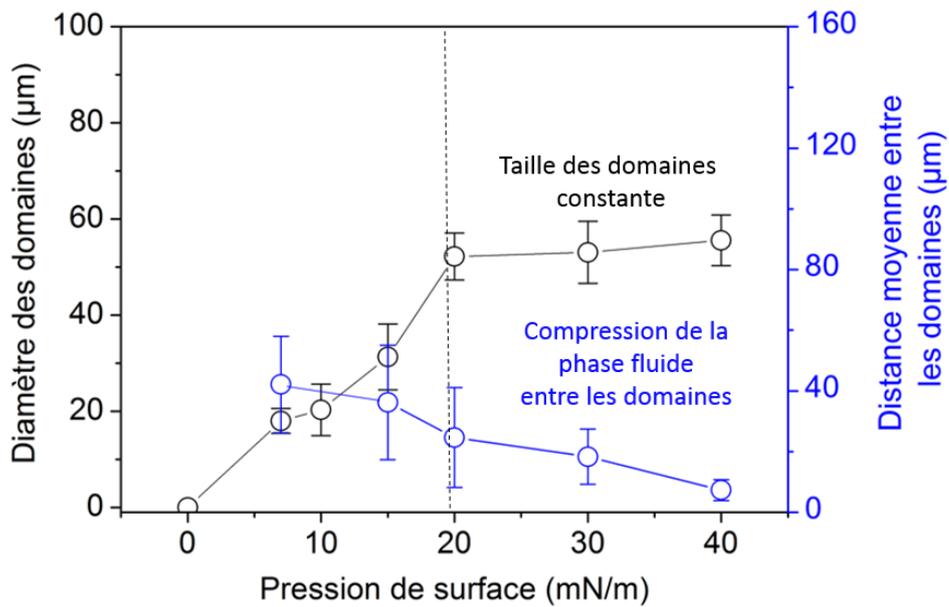
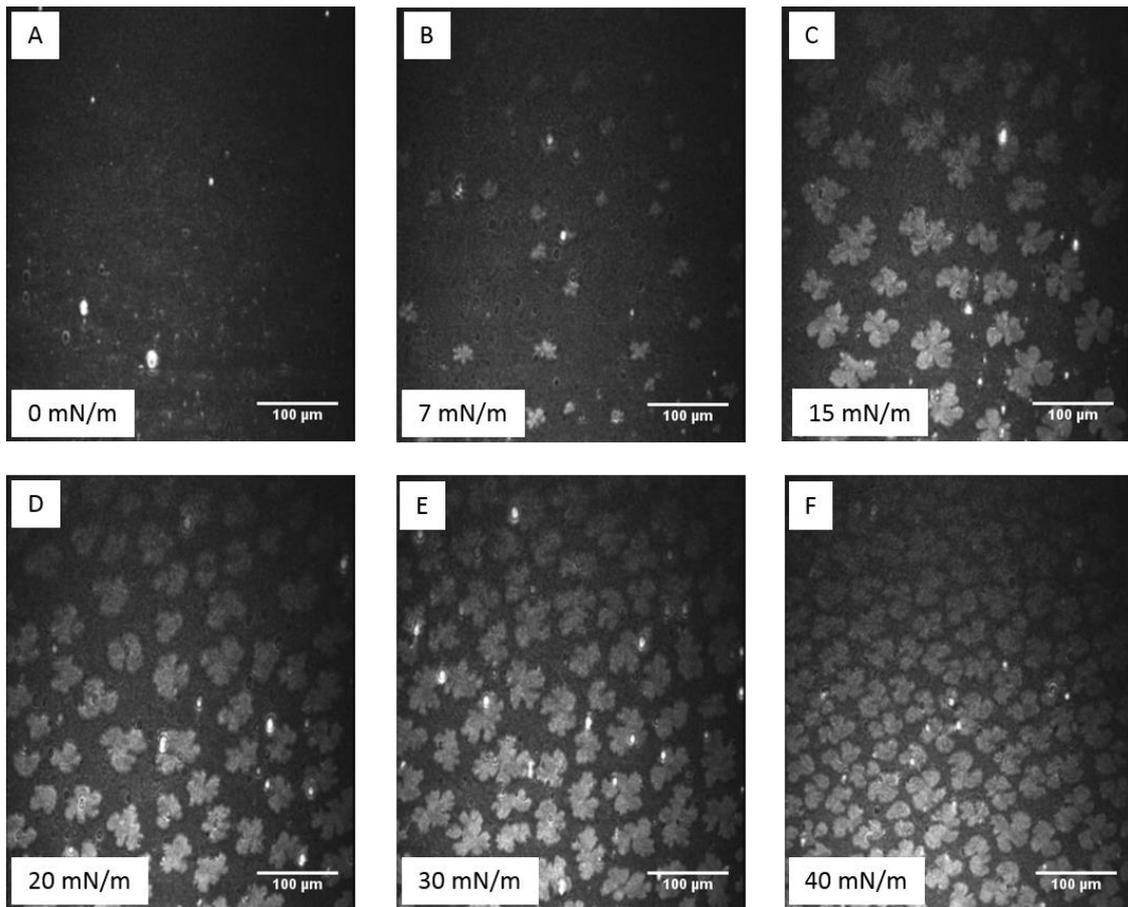


Fig. 11 Images BAM (A-F) montrant l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale à une vitesse de $10 \text{ cm}^2/\text{s}$ contenant $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ particules positives (PSA) dans la sous-phase. Graphique montrant d'une part l'évolution du diamètre moyen des domaines condensés lors de la compression et d'autre part l'évolution de la distance moyenne entre celles-ci

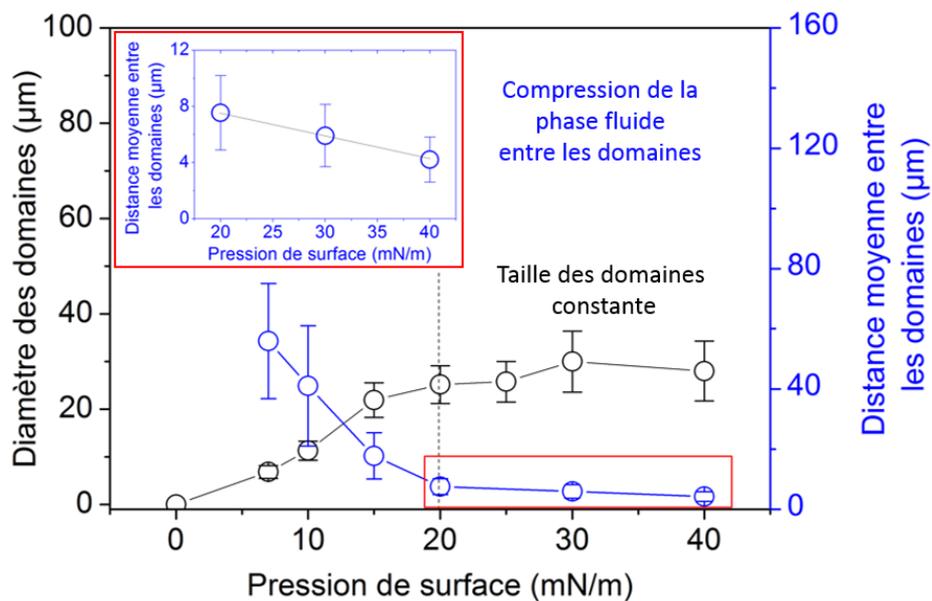
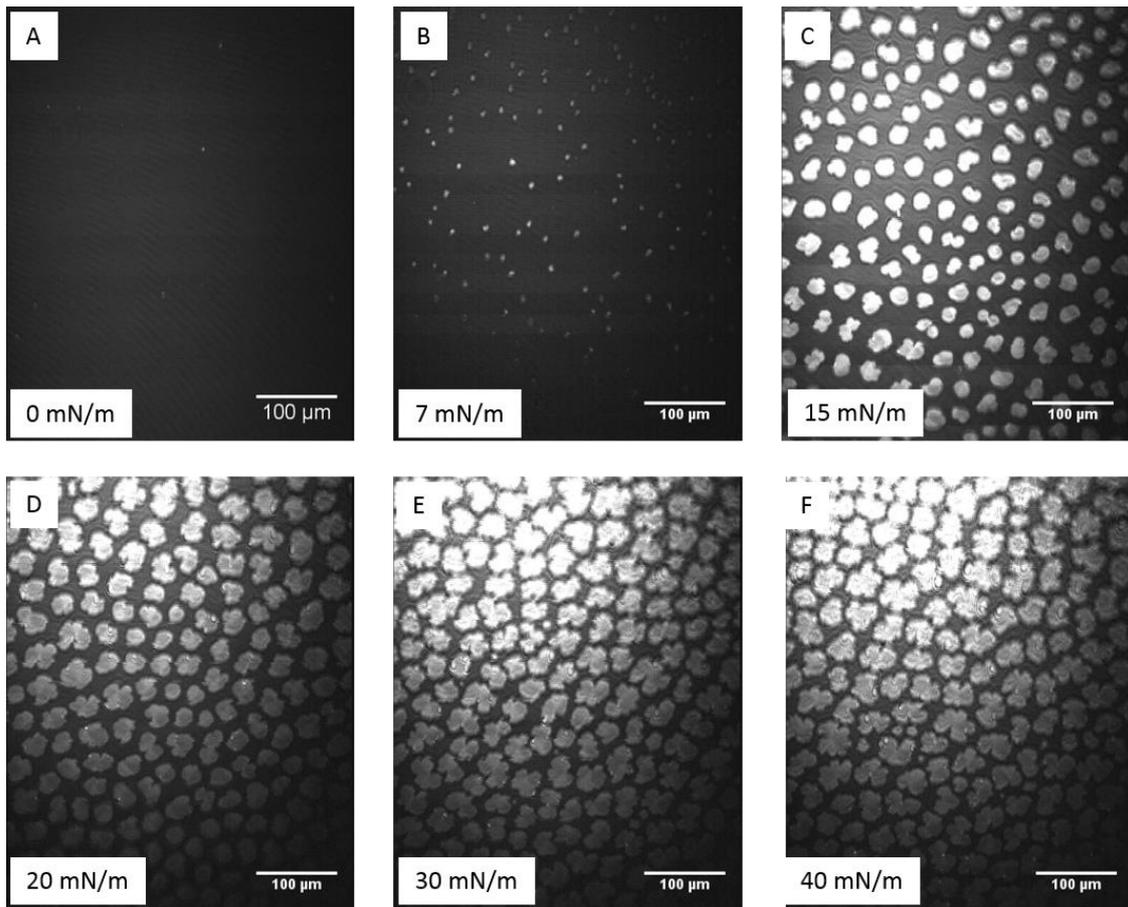


Fig. 12 Images BAM (A-F) montrant l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale à une vitesse de $10 \text{ cm}^2/\text{s}$ contenant $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ particules négatives (PSC) dans la sous-phase. Graphique montrant d'une part l'évolution du diamètre moyen des domaines condensés lors de la compression et d'autre part l'évolution de la distance moyenne entre celles-ci

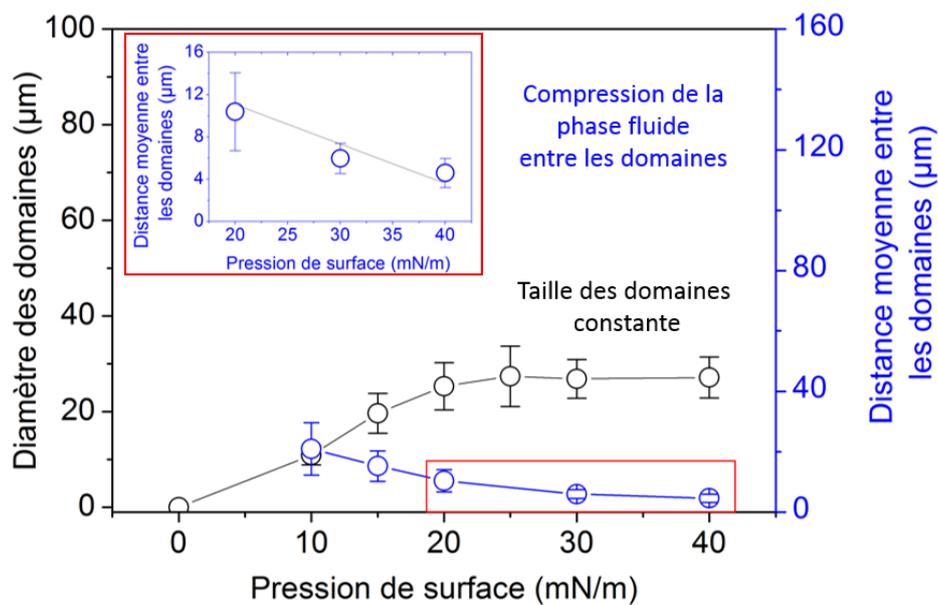
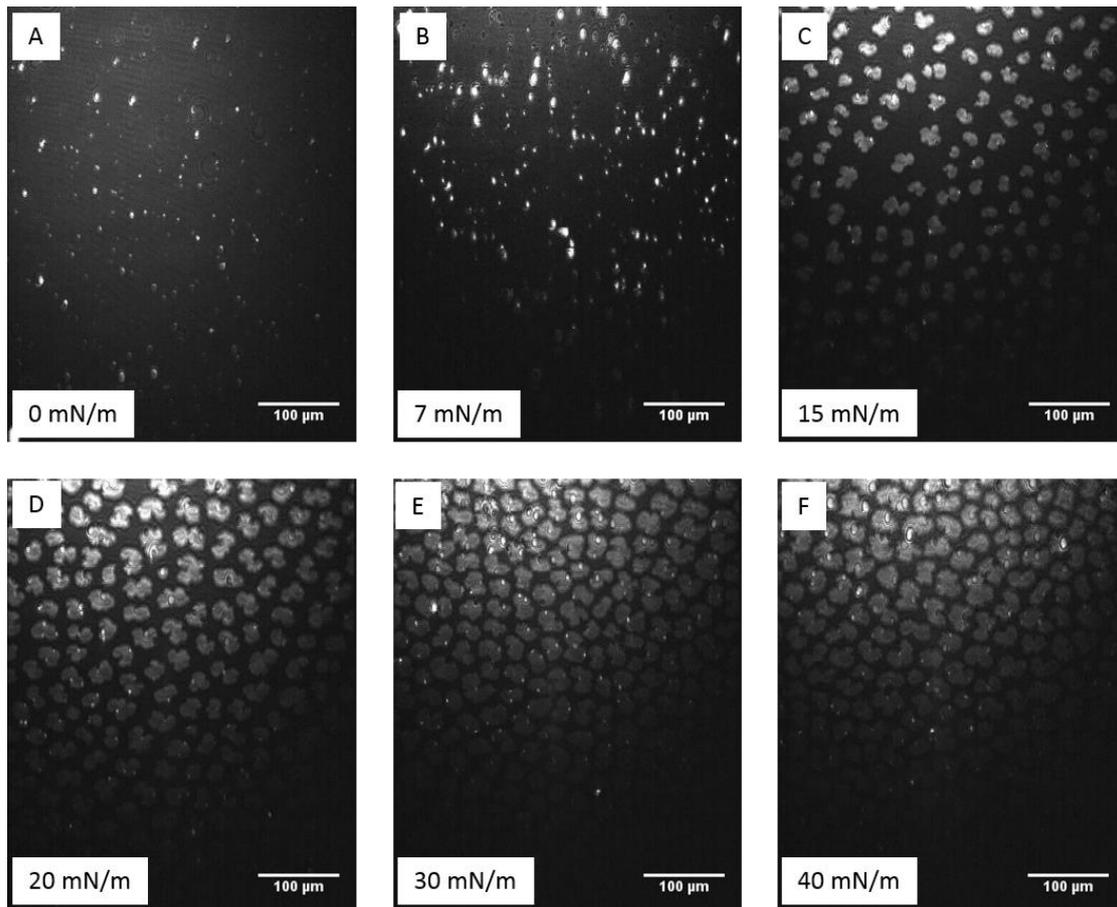


Fig. 13 Images BAM (A-F) montrant l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale à une vitesse de $10 \text{ cm}^2/\text{s}$ contenant $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ particules négatives (PSC) dans la sous-phase. Graphique montrant d'une part l'évolution du diamètre moyen des domaines condensés lors de la compression et d'autre part l'évolution de la distance moyenne entre celles-ci

En suivant la même logique que dans le cas de l'étude des propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire, nous avons étudié par la suite l'effet de deux particules négatives sur la microstructure du surfactant pulmonaire pour essayer d'expliquer la diminution de son module d'élasticité.

E.3.2 Particules négatives vs particules « plus négatives »

L'effet de l'électronégativité de particules sur la microstructure du surfactant pulmonaire a été étudié en utilisant deux types des particules : particules négatives (PSC) et particules «plus négatives» (PSS). La figure 14 met en évidence l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale à un taux de compression de $10 \text{ cm}^2/\text{s}$ contenant $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ particules «plus négatives» (PSS) dans la sous-phase. Le graphique correspondant montre d'une part l'évolution du diamètre moyen des domaines condensés lors de la compression et d'autre part l'évolution de la distance moyenne entre celles-ci confirmant le fait qu'au-delà de la pression de surface de $20 \text{ mN}/\text{m}$, la taille des domaines reste constante et que la compression du surfactant pulmonaire se fait par la compression de la phase fluide entre les domaines.

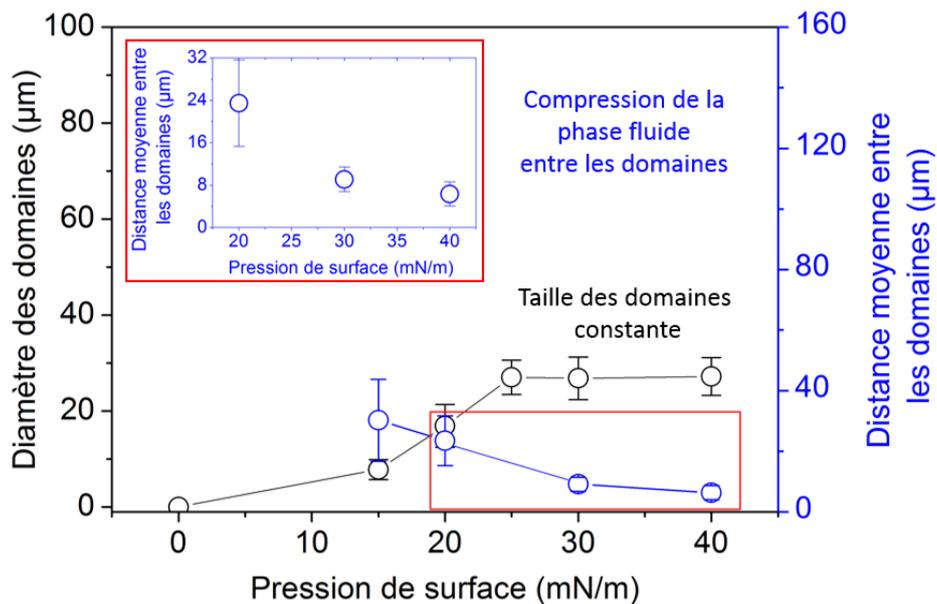
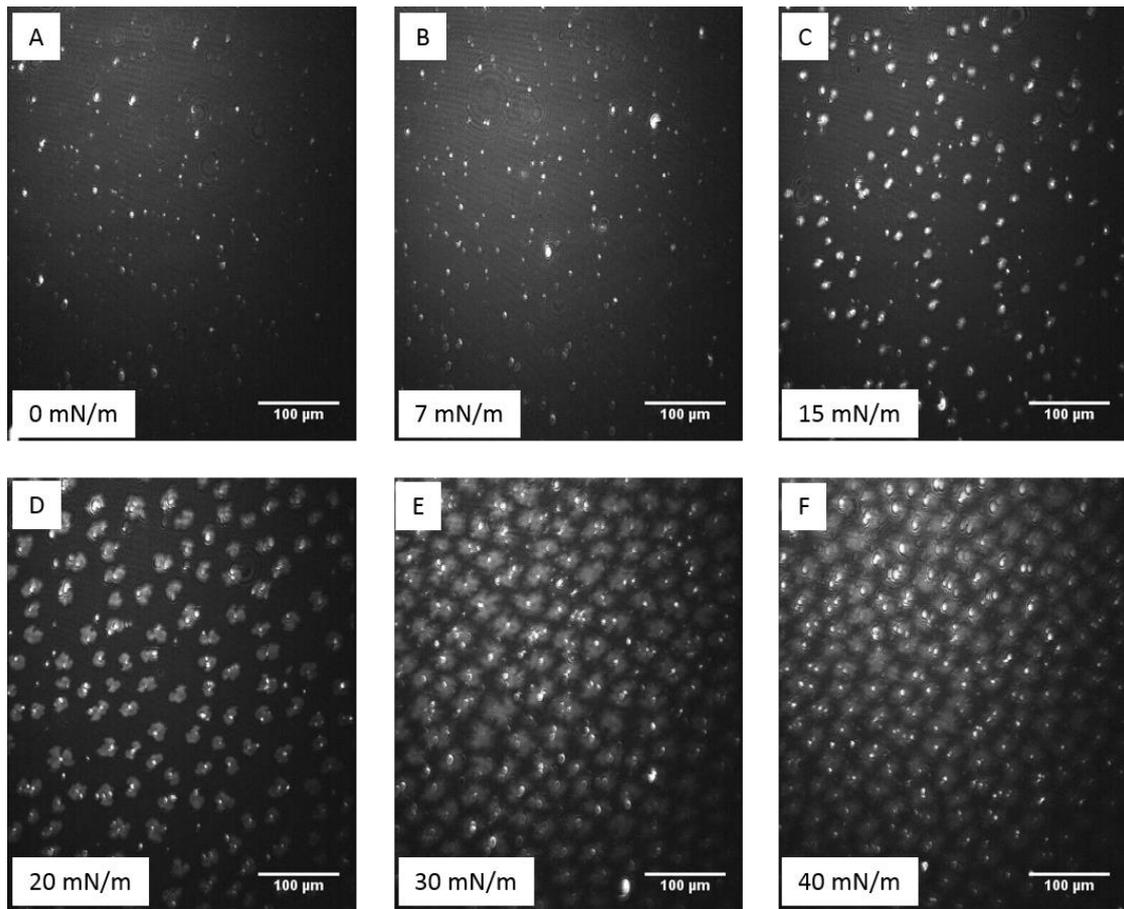


Fig. 14 Images BAM (A-F) montrant l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale à une vitesse de $10 \text{ cm}^2/\text{s}$ contenant $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ particules «plus négatives» (PSS) dans la sous-phase. Graphique montrant d'une part l'évolution du diamètre moyen des domaines condensés lors de la compression et d'autre part l'évolution de la distance moyenne entre celles-ci.

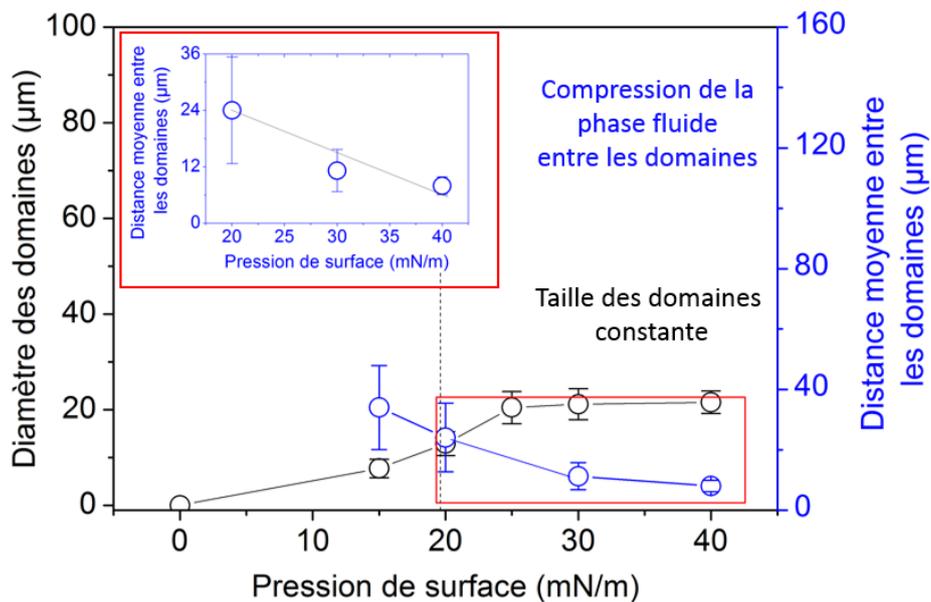
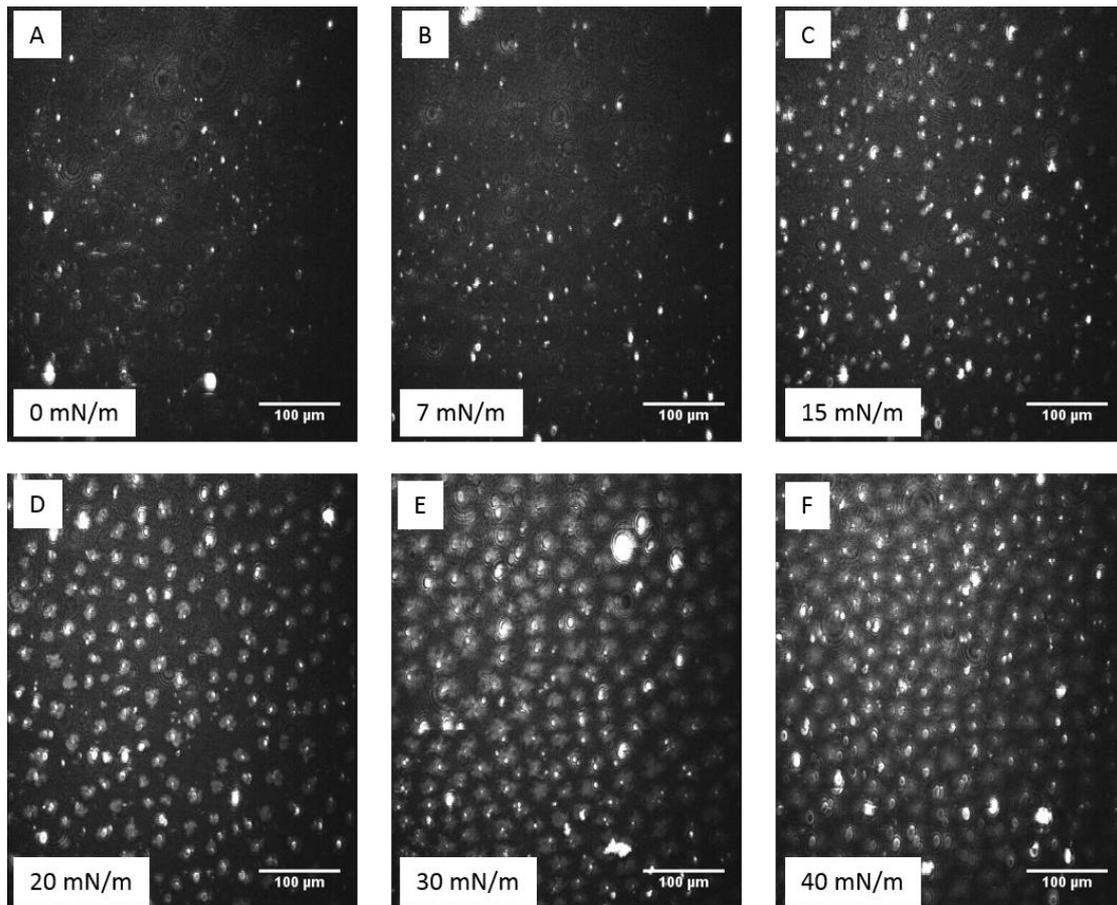


Fig. 15 Images BAM (A-F) montrant l'évolution de la microstructure du surfactant pulmonaire à l'interface air-liquide pendant la compression latérale à une vitesse de $10 \text{ cm}^2/\text{s}$ contenant $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ particules «plus négatives» (PSS) dans la sous-phase. Graphique montrant d'une part l'évolution du diamètre moyen des domaines condensés lors de la compression et d'autre part l'évolution de la distance moyenne entre celles-ci

Si on compare ces résultats à ceux obtenus pour les particules négatives (PSC) on observe :

- une diminution plus importante de la taille des domaines pour les particules «plus négatives» PSS que pour les particules négatives PSC. Cet effet est beaucoup plus important à des concentrations de particules de $3\mu\text{g/ml}$ (Fig. 15), ce qui est en corrélation avec les mesures du module d'élasticité,
- une augmentation de la densité de nucléation dans le cas des particules «plus négatives» (PSS) par rapport aux particules négatives PSC, le rapport solide/fluide restant constant, ce qui indique de plus fortes interactions entre les particules PSS et le surfactant pulmonaire par rapport aux particules PSC.

E.3.3 Conclusions préliminaires et hypothèses

Pour conclure cette section on peut retenir que :

- les particules positives modifient légèrement la microstructure du surfactant pulmonaire, raison pour laquelle aucune modification du module d'élasticité n'a été mesurée, mais ce qui pourrait expliquer la diminution de l'aire de l'hystérésis,
- les particules négatives modifient la microstructure du surfactant pulmonaire en augmentant la densité de nucléation des domaines condensés et par conséquent en limitant la croissance des domaines condensés ce qui explique la diminution des propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire (module d'élasticité et aire de l'hystérésis),
- la diminution de la taille des domaines est beaucoup plus importante pour les particules «plus négatives» (PSS) que les particules négatives (PSC) et par conséquent, aussi les propriétés mécaniques, notamment le module d'élasticité.

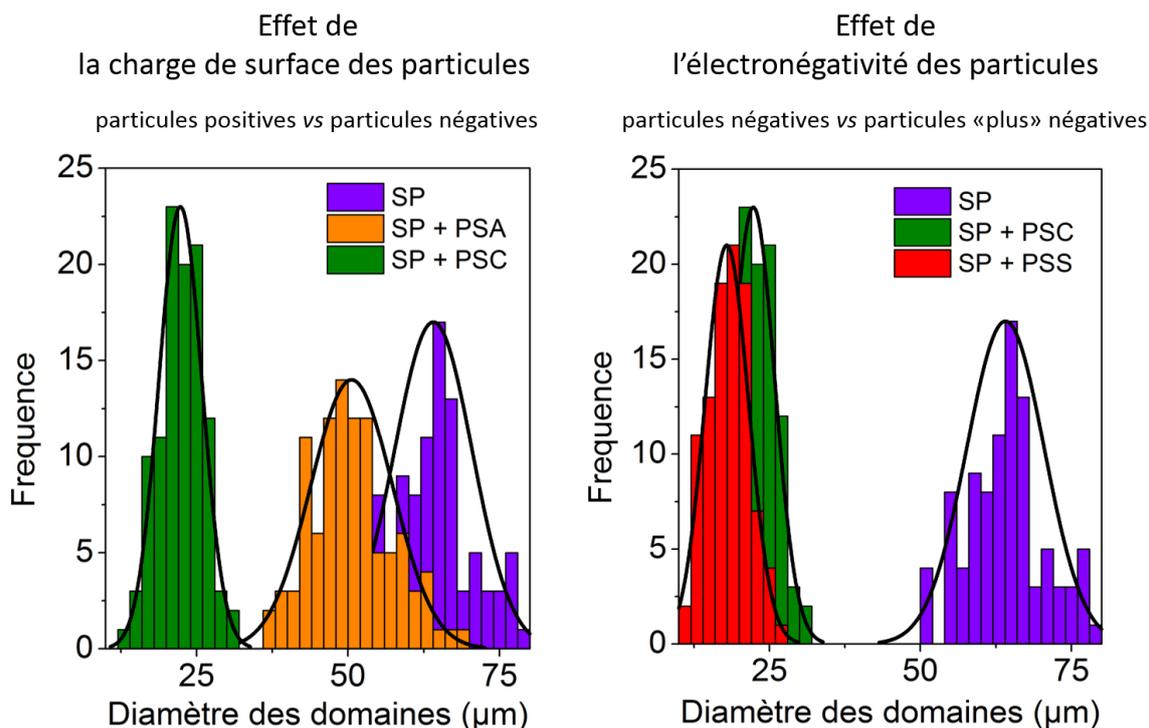


Fig.16 A. Comparaison entre le diamètre des domaines condensés du surfactant pulmonaire (SP), du surfactant pulmonaire en présence de $3\mu\text{g/ml}$ des particules positives (SP + PSA) et du surfactant pulmonaire en présence de $3\mu\text{g/ml}$ des particules négatives (SP + PSC) à une pression de surface de 30 mN/m . B. Comparaison entre le diamètre des domaines condensés du surfactant pulmonaire (SP), du surfactant pulmonaire en présence de $3\mu\text{g/ml}$ des particules négatives (SP + PSC) et du surfactant pulmonaire en présence de $3\mu\text{g/ml}$ des particules « plus négatives » (SP + PSS) à une pression de surface de 30 mN/m

Il est évident qu'il y a une forte dépendance entre les propriétés mécaniques, notamment le module d'élasticité et la microstructure du surfactant pulmonaire, notamment la taille des domaines condensés. Sur la figure 17, il est montré la dépendance linéaire entre le diamètre des domaines condensés du surfactant pulmonaire et son module d'élasticité. On peut observer que la présence des domaines condensés de grande taille rigidifie le surfactant pulmonaire en augmentant le module d'élasticité tandis que la présence des petits domaines condensés « assouplit » le surfactant pulmonaire en diminuant le module d'élasticité.

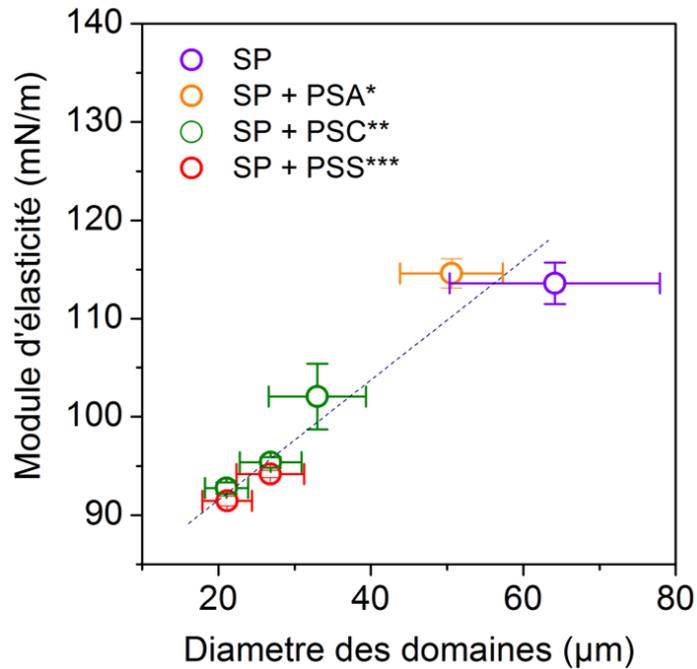
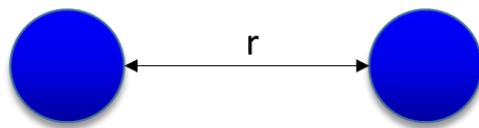


Fig.17 La variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire en fonction du diamètre des domaines condensés

Pour confirmer cette hypothèse, un modèle numérique simplifié a été créé par les moyens de la dynamique moléculaire.

E.3.4 Confirmation des hypothèses : modélisation dynamique moléculaire

Pour confirmer la dépendance linéaire entre le diamètre des domaines condensés du surfactant pulmonaire et son module d'élasticité, un modèle numérique simplifié, en 2-D a été conçu. Ce modèle simule le surfactant pulmonaire contenant des domaines condensés de différents diamètres. Chaque tête lipidique est assimilée à une sphère. Entre les sphères un potentiel de Lennard-Jones (eq.1.1) a été utilisé, car il donne le potentiel d'interaction intermoléculaire V_{LJ} le plus réaliste et simple entre deux atomes/molécules distants de r .



$$V_{LJ}(r) = \begin{cases} 4 * \varepsilon * \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] & \text{pour } r < r_c \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (1.25)$$

Avec r_c la distance pour laquelle $V_{LJ} = 0$

Les paramètres ε et σ ont été choisis de telle manière à reproduire les deux phases : les domaines condensés et la phase fluide.

Interaction	ε	σ
Solide-solide	1	3.5
Solide-fluide	0.5	4
Fluide-fluide	0.5	4

Tableau 1 Les paramètres d'interaction de Lennard-Jones entre les têtes lipidiques

Les domaines condensés ont été créés de telle manière qu'ils occupent 50 % de la surface totale de la boîte de simulation. (Fig. 18). Les sphères (têtes lipidiques) qui forment les domaines, sont plus denses que les sphères qui forment la phase fluide. Des conditions périodiques dans les deux directions (x et y) ont été fixées. La figure 18 montre les différents types de surfactant pulmonaire utilisées.

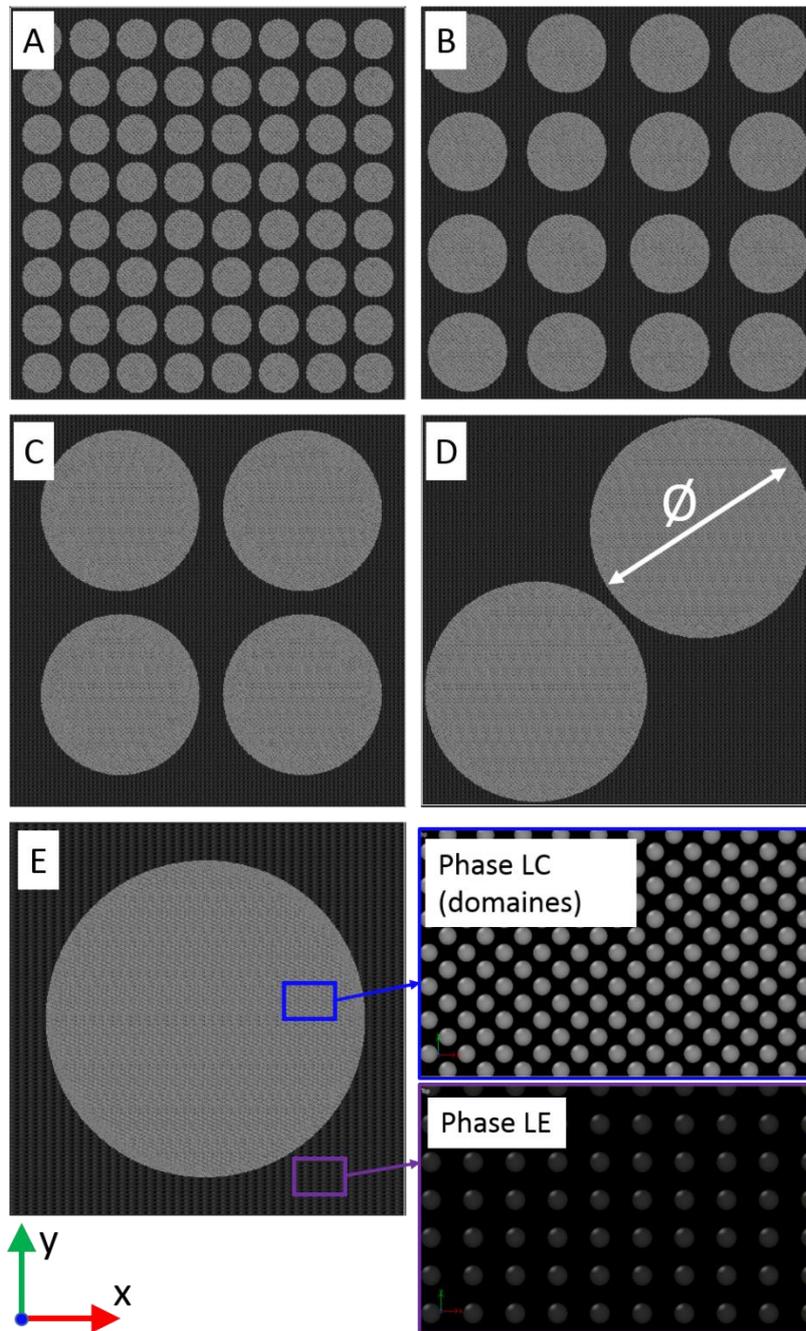


Fig. 18 Modèles numériques 2D du surfactant pulmonaire avec différents diamètres (en unités arbitraires A.U.) des domaines condensés. A. $\varnothing = 5$, B. $\varnothing = 10$, C. $\varnothing = 20$, D. $\varnothing = 28$, E. $\varnothing = 40$

Des déformations relatives (compression) de 8% (qui permettent d'avoir une réponse quasi-linéaire en pression) sur la direction x ont été imposées et la pression à l'intérieur de la monocouche a été mesurée. Sur la figure 19 sont montrées les courbes de pression en fonction de la compression du surfactant pulmonaire obtenues en utilisant le modèle numérique.

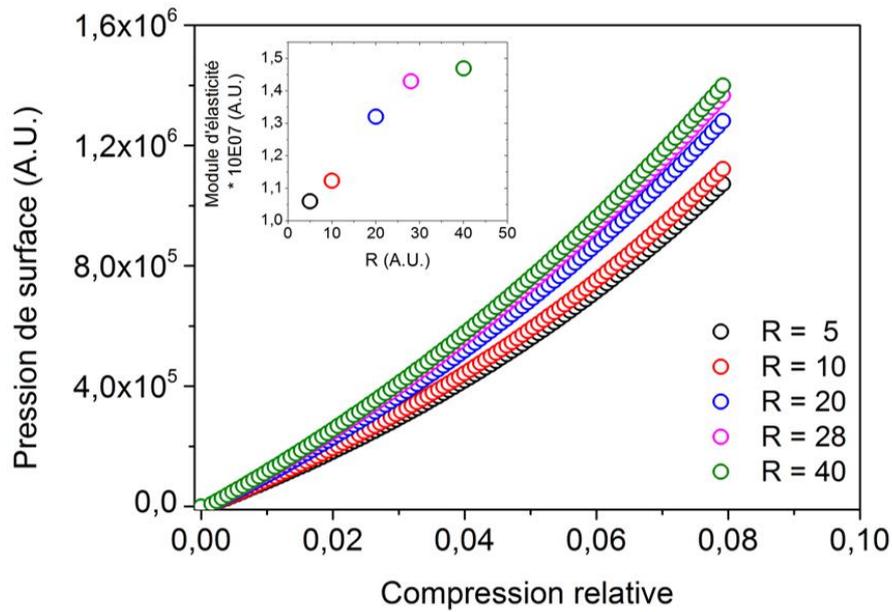


Fig. 19 Variation de la pression du surfactant pulmonaire en fonction de la compression relative. Le graphique présenté dans le coin supérieur gauche représente la variation du module d'élasticité en fonction de la taille des domaines

Le module d'élasticité a été calculé à partir de la pente de ces courbes., les valeurs obtenu étant montrés dans le graphique dans le coin supérieur gauche de la figure 19 et sur la figure 20B. On observe une augmentation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire en fonction de la taille des domaines condensés.

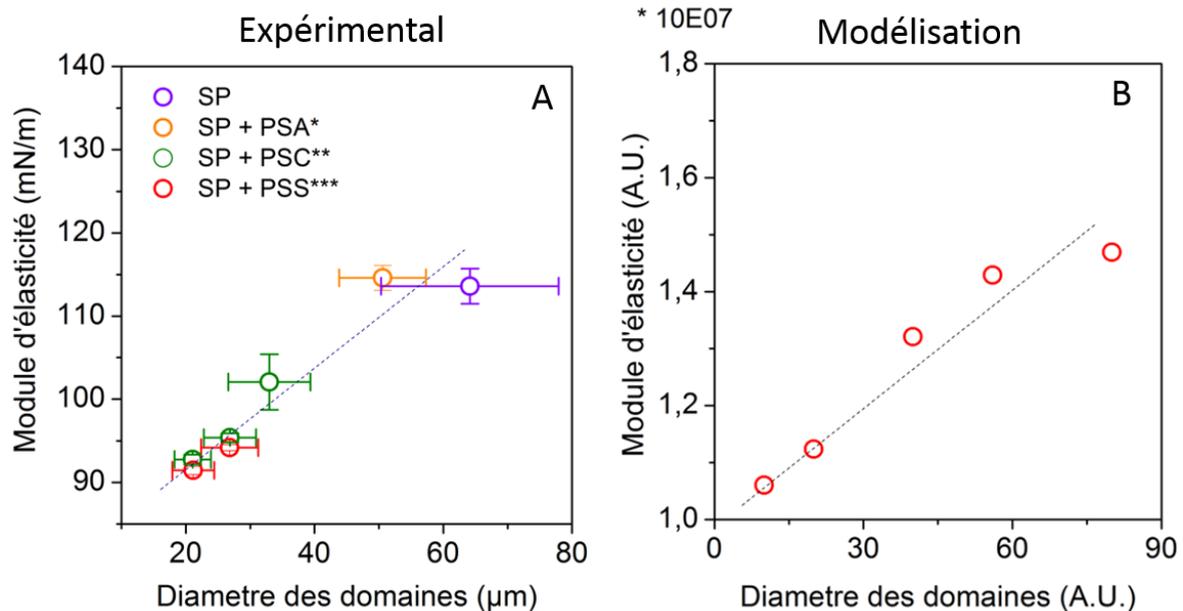


Fig. 20 Comparaison entre la variation du module d'élasticité du surfactant pulmonaire en fonction du diamètre des domaines condensés. A : les valeurs obtenues en utilisant le modèle expérimental du surfactant pulmonaire B : les valeurs obtenues en utilisant le modèle numérique du surfactant pulmonaire

En conclusion, on observe une bonne corrélation entre les résultats expérimentaux et les résultats numériques. Par conséquent il est logique de conclure que ces résultats confirment que la raison principale de la diminution du module d'élasticité du surfactant pulmonaire quand il interagit avec les particules négatives est la modification de sa microstructure, plus précisément la diminution de la taille des domaines condensés. Mais les mécanismes de diminution de la taille des domaines condensés en présence des particules négatives ne sont pas encore connus, bien que ce phénomène ait été observé aussi sur d'autres systèmes en utilisant différentes particules comme par exemple : particules de gélatine (Lai, et al., 2010), polystyrène (Farnoud, et al., 2012) ou silice (Guzmán, et al., 2012). En conséquence, par la suite, plusieurs techniques expérimentales ont été employées pour comprendre les mécanismes de changement de la microstructure du surfactant pulmonaire quand il interagit avec les particules.

E.4 Origine des changements de la microstructure : interaction avec les particules

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à la diminution de la taille des domaines condensés, un essai expérimental en trois étapes a été réalisé (Fig. 21) et qui a permis d'établir plusieurs hypothèses. Ainsi :

1. Dans une première étape, des particules négatives de PSC ont été injectées dans la sous-phase du surfactant pulmonaire à une pression de surface de 30 mN/m, donc qui contient des domaines condensés déjà formés. Immédiatement après l'injection des particules, on observe la fusion des domaines condensés probablement due à l'adsorption des particules négatives au bord des domaines. Toutefois, aucune modification de la taille des domaines n'a été observée.

2. Dans une deuxième étape, le surfactant pulmonaire a été décompressé à la pression de 0 mN/m. Evidemment toutes les domaines ont disparu puisque le surfactant pulmonaire est en phase LE (liquide-expansé).

3. Dans une troisième étape, le surfactant pulmonaire a été de nouveau compressé de manière lente à la pression de surface de 30 mN/m. On observe ainsi, une augmentation de la densité des domaines (densité de nucléation) et la formation des nombreux domaines de petite taille.

Pour expliquer ces résultats plusieurs hypothèses peuvent être émises qui vont être prouvées par la suite :

1. Les particules positives ont une adhésion plus faible sur le surfactant pulmonaire par rapport aux particules négatives.

2. Les particules négatives ont une grande affinité pour le bord des domaines ce qui conduit à une modification de la tension de ligne et à la fusion des domaines.

3. Les particules négatives s'adsorbent d'avantage sur la phase fluide (LE) que sur la phase solide (domaines condensés).

4. Les particules adsorbées sur la phase fluide induisent la formation de pointes de condensation locale (centres de nucléation), qui lors de la compression forment des domaines condensés. Comme de nombreuses particules s'adsorbent sur la phase fluide (LE), des nombreuses zones de nucléation vont apparaitre, ce qui conduit à la formation des nombreux domaines condensés de petite taille. Comme on a montré précédemment, la diminution de la surface des domaines est la raison principale de la diminution du module d'élasticité donc de l'efficacité du surfactant pulmonaire.

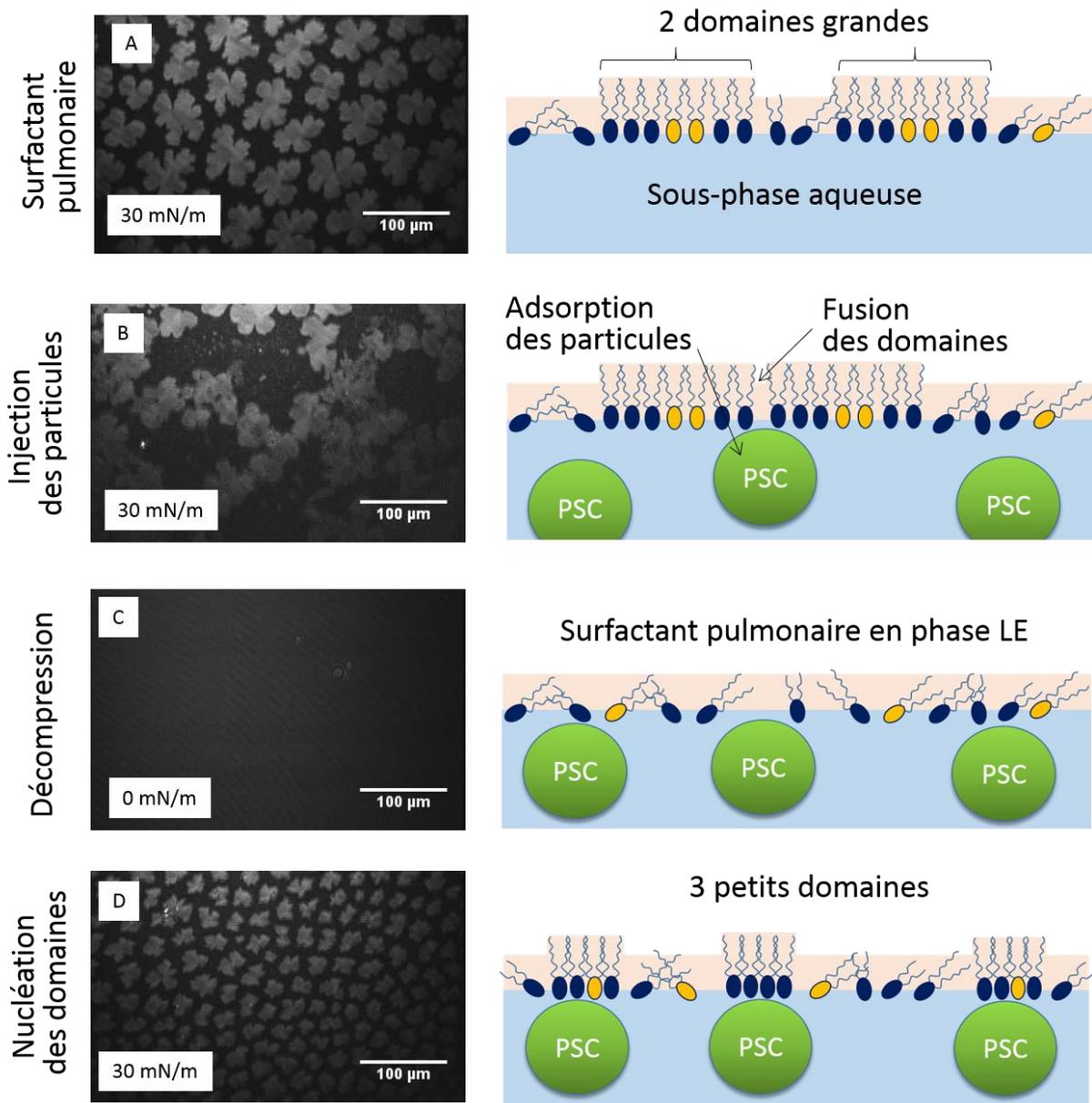


Fig. 21 Hypothèses de l'adsorption des particules négatives. Images BAM et représentation schématique (pas à l'échelle). A. Microstructure du surfactant pulmonaire à 30 mN/m sans particules. B. Microstructure du surfactant pulmonaire après l'injection de 3 μg/ml de particules négatives (PSC) dans la sous-phase. C. Microstructure du surfactant pulmonaire à 0 mN/m (après la décompression). D. Recompression du surfactant pulmonaire à 30 mN/m contenant les particules négatives dans la sous-phase.

E.4.1 Adhésion et adsorption des particules sur le surfactant pulmonaire : Condensation et nucléation des lipides

Pour mesurer l'adhésion de particules sur le surfactant pulmonaire, la Microscopie de Force Atomique (AFM) a été utilisée. Ainsi, des particules de verre ont été collées sur des leviers AFM (Carl, et al., 2008). La taille minimale des particules qu'il est possible de coller sur des leviers AFM par les méthodes actuelles est de 4 μm. Par conséquent nous avons choisi des particules d'une taille de 4 μm qui ont été collées sur des leviers AFM d'une faible raideur (~0.1 N/m). Pour cela deux types des particules de verre ont été choisis :

1. Particules négatives - particules de silice qui portent sur leur surface des groupements silanols SiOH. Par conséquent, les protons H^+ peuvent être libérés, laissant des ions SiO^- sur la surface, rendant donc la surface de la particule négative (McNamee, et al., 2010).

2. Particules positives - particules de silice greffées qui portent sur leur surface des groupements NH_3^+ . Les particules de silice ont été greffées⁶³ avec des groupements chimiques (3-Aminopropyl)-triéthoxysilane. (APTES). Ces groupements ont été liés de manière covalente aux groupements silanols SiOH présents sur la surface des particules de silice (Mirea, et al.).

Les mesures de force en Microscopie de Force Atomique (AFM) ont été utilisées pour mesurer la force d'adhésion en milieu liquide entre les particules collées sur les leviers AFM et le surfactant pulmonaire déposé sous forme de bicouche sur des substrats de verre. Le principe de la mesure de force AFM (Fig. 22) consiste à mesurer la déflexion du levier de l'AFM lors de son approche (compression) et de son retrait (décompression) de la surface testée. La boucle d'asservissement qui maintient constante la position du levier est neutralisée ce qui fait que le système d'acquisition du signal est capable de tracer la variation de la déflexion dZ détectée par la photodiode (qui donne la force), en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon imposée par le piézoélectrique suivant l'axe Z (perpendiculaire à la surface de la bicouche de surfactant pulmonaire). Cette variation est présentée sous forme d'une courbe de force, dont l'allure générale est présentée sur la figure 22 où F_{adh} est la force d'adhésion (Trunfio-Sfarghiu, 2006).

Le surfactant pulmonaire a été déposé sous forme de bicouche sur des substrats de verre par la technique de Langmuir-Blodgett à une pression de 40 mN/m. Le milieu d'hydratation est toujours le tampon tris à pH 7.4 contenant 0.15 M NaCl et les interactions se font toujours entre les particules et les têtes lipidiques.

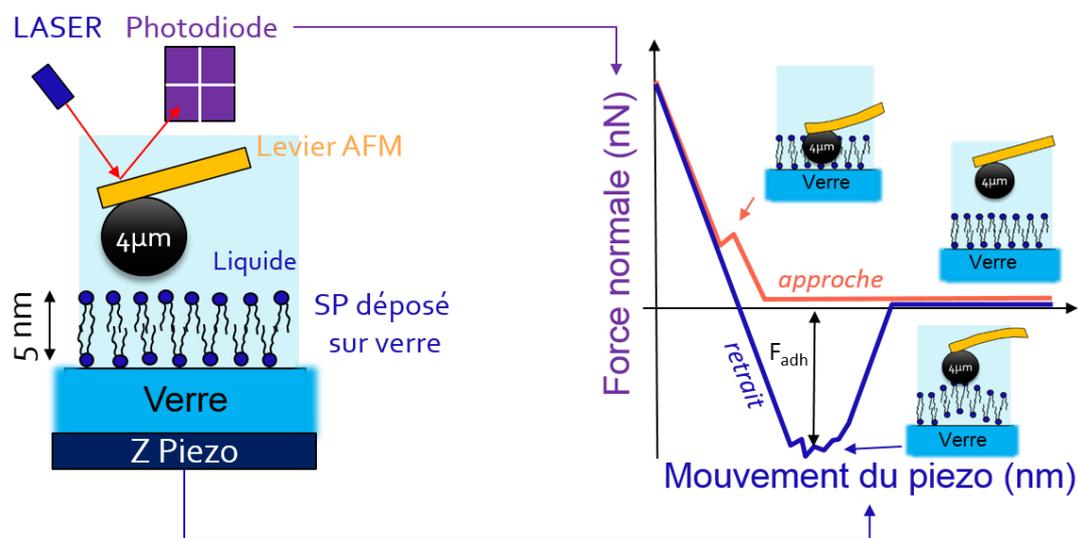


Fig. 22 Représentation d'une courbe de force AFM. La courbe rouge est la courbe d'approche tandis que la courbe bleue est la courbe de retrait

Sur la figure 23 sont montrés les histogrammes correspondants aux forces d'adhésion entre les particules positives respectivement négatives et le surfactant pulmonaire déposé sur des substrats de verre.

⁶³ Voir l'Annexe 1

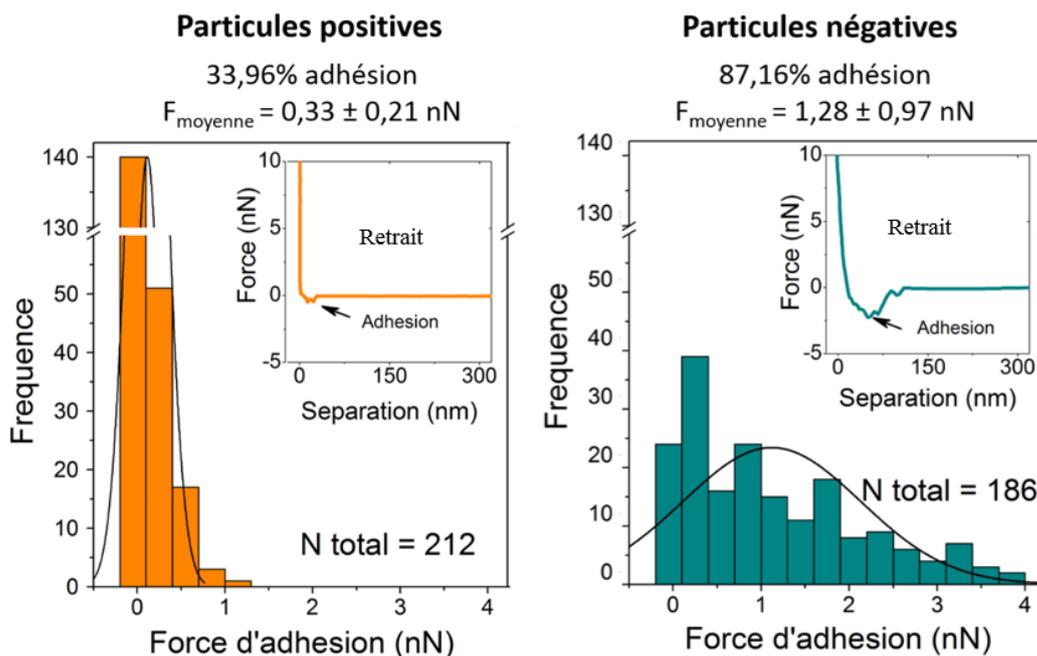


Fig. 23 Histogrammes montrant les forces l'adhésion des particules sur le surfactant pulmonaire ; Le graphique présenté dans le coin supérieur droit représente un exemple de courbe retrait

Comme attendu, les particules positives et les particules négatives présentent des forces d'adhésion différentes lors de leurs interactions avec le surfactant pulmonaire. Ainsi, dans le cas de particules avec des charges de surface positives, seulement pour 33.9% des courbes enregistrées, le pic correspondant à la force d'adhésion est présent et la force d'adhésion moyenne est $0.3 \pm 0.2 \text{ nN}$. Pour le reste de courbes, la force d'adhésion est 0.

En revanche, dans le cas de particules négatives, le pic correspondant à la force d'adhésion est présent sur 87.1% de courbes enregistrées. Dans ce cas, la force d'adhésion moyenne est $1.2 \pm 0.9 \text{ nN}$.

Cette différence est liée à la présence des charges électriques différentes sur la surface des particules, ce qui pourrait être à l'origine de la modification de la microstructure du surfactant pulmonaire qui conduit à la diminution de son module d'élasticité.

Pour confirmer ces résultats, nous avons incubé les bicouches de surfactant pulmonaire, déposé sur des substrats de verre, avec les mêmes types de particules de verre (positives et négatives). Cependant, on a choisi des particules beaucoup plus petites (500 nm) pour s'affranchir des problèmes de sédimentation. La concentration initiale des particules pour l'incubation (valeur qui correspond à un nombre de particules en suspension) a été calculée à partir du nombre de particules nécessaire pour couvrir 50% de la surface de la bicouche. Le temps d'incubation a été de 30 min. Après l'incubation, chaque échantillon était rincé 5 fois avec du tampon. Sur la figure 24 sont montrées les images de fluorescence du surfactant pulmonaire incubé avec les particules de verre positivement respectivement négatives.

On observe que :

- Aucune particule positive n'est adsorbée sur le surfactant pulmonaire (Fig.24a). Cela peut être expliqué par la force d'adhésion faible qui agit entre la particule positive et le

surfactant pulmonaire. En effet, à cause de cette faible force d'adhésion, même si les particules s'adsorbent, elles se détacheront lors du rinçage,

- Les particules négatives s'adsorbent sur le surfactant pulmonaire, elles ne se détachent pas lors du rinçage et elles peuvent être observées sous forme des points brillants sur le surfactant pulmonaire (Fig.24b). En plus, ces particules sont adsorbées plutôt au voisinage des domaines condensés (domaines noirs) et sur la phase fluide (fond vert). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le DPPS (chargé négativement) est situé principalement au centre des domaines et secondairement dans la phase fluide (voir chapitre D.3.3.2, Fig.23).

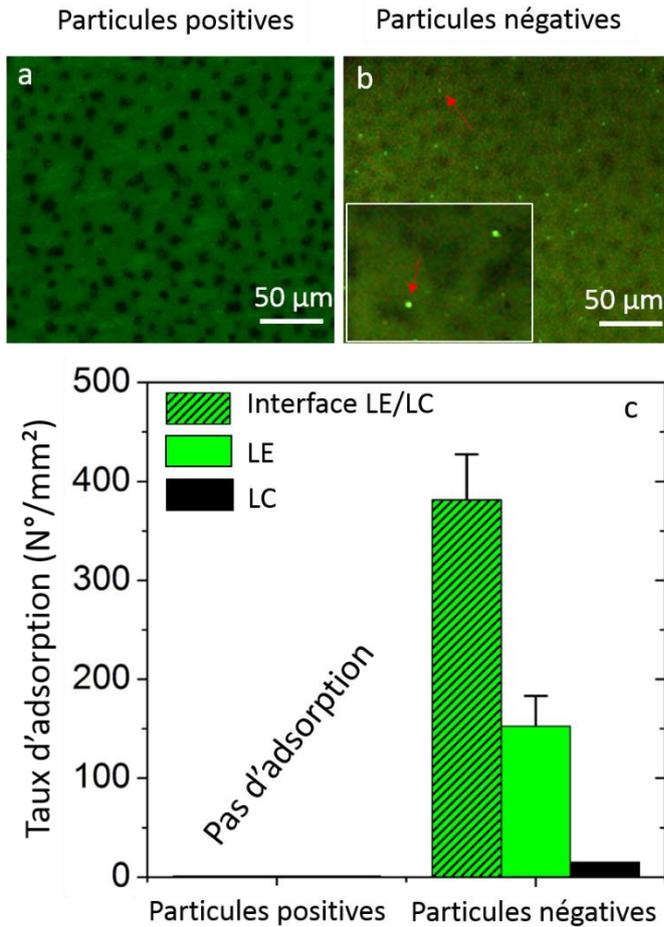


Fig.24 Images de fluorescence d'une bicouche de surfactant pulmonaire (+1% Marquer fluorescent NBD-PC) déposé sur verre incubé avec les particules de verre :

(a) positives et (b) négatives

(c) le taux d'adsorption des particules (nombre des particules adsorbées par mm²) pour les différentes régions du surfactant pulmonaire

LC : domaines condensés (liquide-condensé)

LE : la phase fluide entre les domaines (liquide expansé)

Les flèches rouges servent de guide pour les yeux

En effet les têtes de DPPS présentent deux charges négatives et une charge positive, étant donc un anion et par conséquent, à cause des forces de répulsion électrostatique, les particules négatives vont s'adsorber sur les régions pauvres en DPPS, c'est-à-dire aux bords des domaines condensés et sur la phase fluide.

En revanche, les têtes de DPPC sont zwitterioniques, c'est-à-dire qu'elles possèdent des charges électriques formelles d'une unité, de signes opposés, situées en général sur des atomes non adjacents. En effet, elles sont composées d'un groupement positif triméthylammonium (NH₃⁺) vers la sous-phase aqueuse et un groupement négatif carboxyle (COO⁻) vers les queues lipidiques. L'angle entre la ligne imaginaire qui connecte ces deux charges électriques et la ligne imaginaire perpendiculaire à la bicouche de surfactant pulmonaire (angle d'inclinaison) est d'environ 12° (Stillwell, 2013). L'interaction avec les particules chargées modifie cet angle. Ainsi, les particules positives interagissent principalement avec le groupement positif ammonium en augmentant l'angle d'inclinaison. Par conséquent les têtes lipidiques deviennent

plus volumineuses (Yang, et al., 2010). Dans ce cas, les molécules de DPPC vont adopter une forme de tronc de cône inversé (Fig.25) ce qui va induire une courbure positive dans la bicouche de surfactant pulmonaire et par conséquent une petite aire de contact avec la particule positive, donc les interactions sont faibles (faible force d'adhésion) et aucune particules ne reste adsorbée.

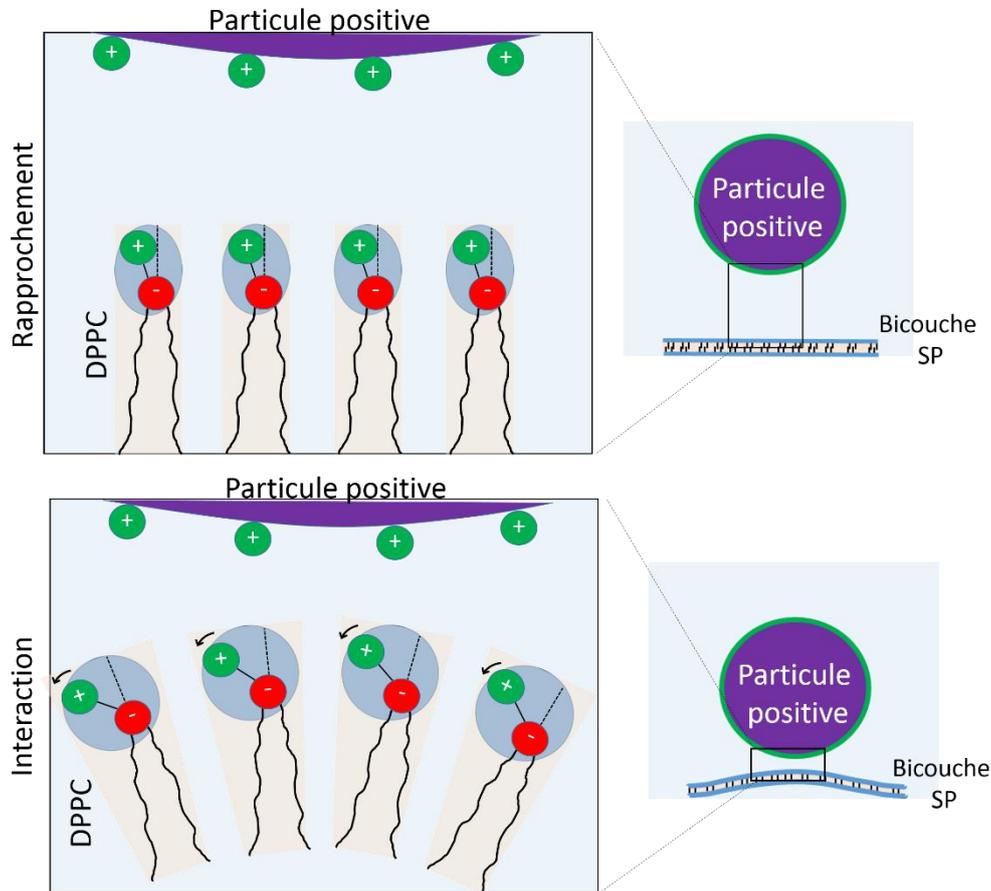


Fig. 25 Représentation schématique de l'interaction des particules positives avec le surfactant pulmonaire (SP). Des interactions électrostatiques répulsives apparaissent entre la surface de la particule et le groupement ammonium de la tête lipidique ce qui conduit à l'augmentation de la tête lipidique. Les molécules de DPPC vont adopter une forme de tronc de cône inversé ce qui va induire une courbure positive dans la bicouche de surfactant pulmonaire et par conséquent une petite aire de contact avec la particule positive

En revanche, les particules négatives, due aux interactions électrostatiques attractives entre la surface de la particule et le groupement ammonium des têtes lipidiques, vont allonger et diminuer le volume de celles-ci. Les molécules de DPPC vont adopter une forme de tronc de cône ce qui va induire une courbure négative dans la bicouche de surfactant pulmonaire et par conséquent une grand aire de contact avec la particule, en favorisant les interactions.

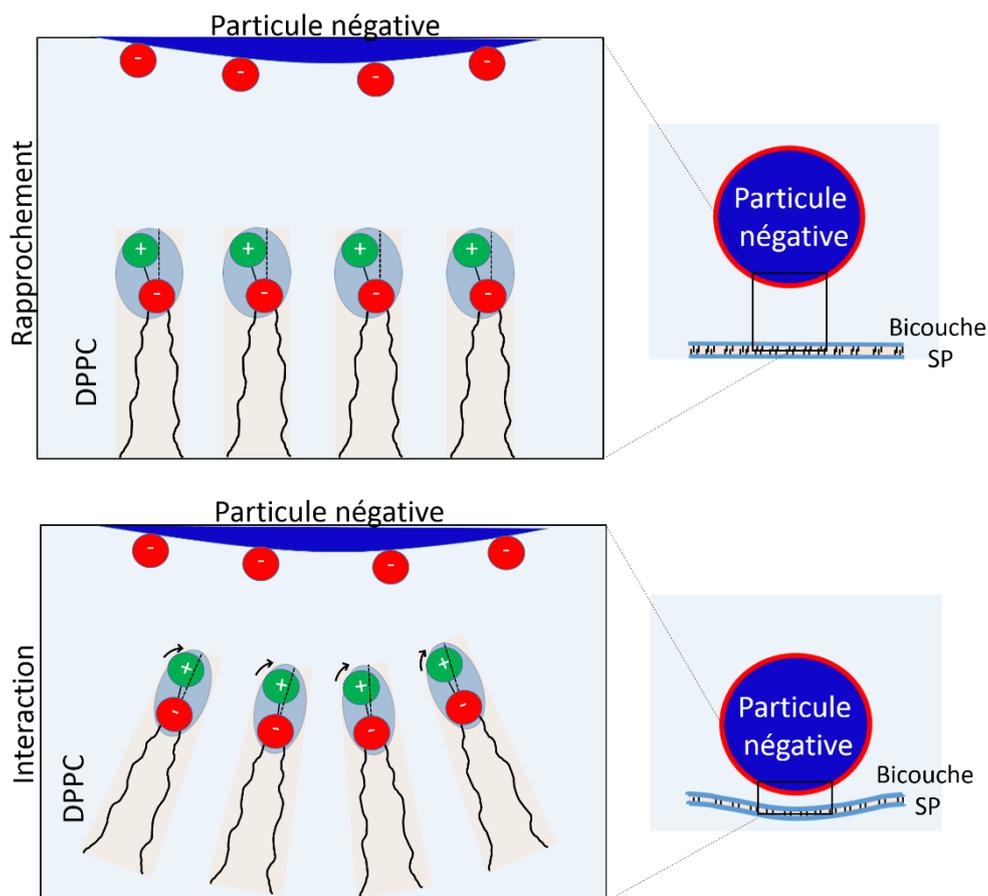


Fig. 26 Représentation schématique de l'interaction des particules négatives avec le surfactant pulmonaire (SP). Des interactions électrostatiques attractives apparaissent entre la surface de la particule et le groupement ammonium de la tête lipidique ce qui conduit à la diminution de la tête lipidique. Les molécules de DPPC vont adopter une forme de tronc de cône ce qui va induire une courbure négative dans la bicouche de surfactant pulmonaire et par conséquent une grande aire de contact avec la particule positive

Ces phénomènes, décrits également par (Yang, et al., 2010) et (Wanga, et al., 2008), peuvent expliquer la différence des forces d'adhésion mesurée par AFM entre les particules et le surfactant pulmonaire et aussi leur adsorption.

Pour aller plus loin et expliquer l'impact de l'électronégativité des particules sur leur adsorption sur le surfactant pulmonaire nous avons incubé les particules de polystyrène négatives (PSC) et «plus négatives» (PSS), les résultats étant montrés sur la figure 27. On observe que :

- les deux types de particules s'adsorbent sur le surfactant pulmonaire, les deux étant des particules négatives,
- les particules «plus négatives» (PSS) ont un taux d'adsorption supérieur que les particules négatives (PSC),
- le taux d'adsorption est directement proportionnel au potentiel zêta des particules, c'est-à-dire que plus la particule est négative plus elle va s'adsorber sur le surfactant pulmonaire.

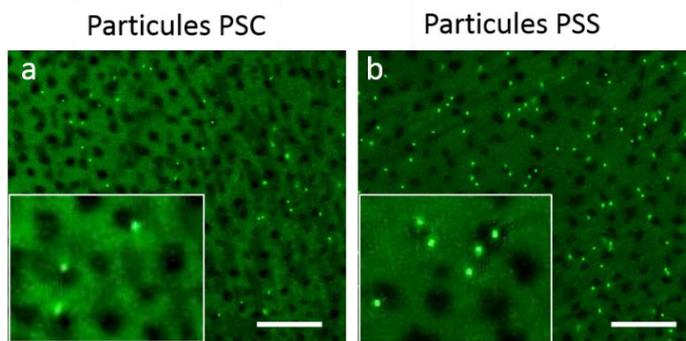
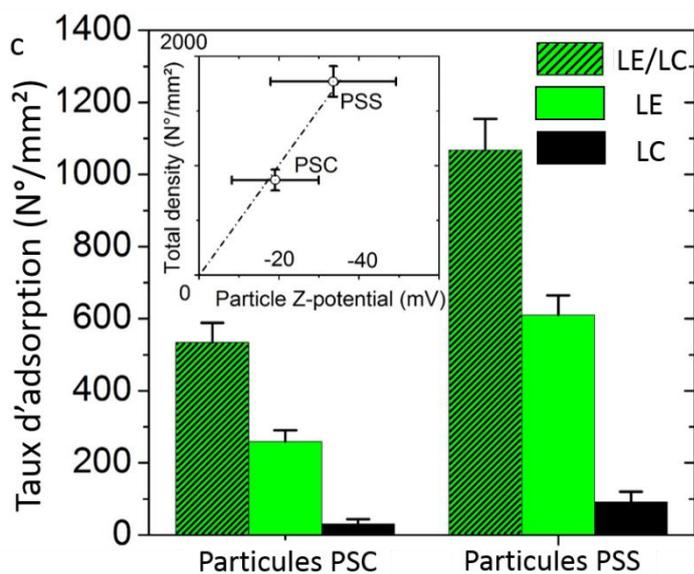


Fig.27 Images de fluorescence d'une bicouche de surfactant pulmonaire (+1% Marquer fluorescent NBD-PC) déposé sur verre incubé avec les particules de polystyrène :

(a) négatives (PSC) et (b) «plus négatives» (PSS)



(c) taux d'adsorption des particules (nombre des particules adsorbées par mm²) pour les différentes régions du surfactant pulmonaire :

LC : domaines condensés (liquide-condensé)

LE : la phase fluide entre les domaines (liquide expansé)

Le graphique présenté dans le coin supérieur gauche représente la variation du taux d'adsorption des particules en fonction de leur potentiel zéta

Les résultats obtenus mettent en évidence l'impact de l'électronégativité des particules sur leur adsorption sur le surfactant pulmonaire qui pourrait être à l'origine de la modification de la microstructure du surfactant pulmonaire et par conséquent de la diminution de ses propriétés mécaniques.

L'adsorption des particules négatives sur le surfactant pulmonaire et le changement d'angle d'inclinaison de la tête lipidique qui en résulte, peut également condenser localement les lipides en diminuant la taille de leurs têtes favorisant ainsi un meilleur arrangement des lipides. Ce phénomène peut donc créer localement des zones de condensation qui peuvent être détectées par la mesure du coefficient de diffusion des lipides. Il est connu que les lipides sont dans un mouvement brownien continu et diffuseront plus lentement (coefficient de diffusion faible) dans une zone condensée que dans une zone non-condensée (coefficient de diffusion élevé). Pour détecter ces changements, on a mesuré le coefficient de diffusion des lipides par la technique de Redistribution de Fluorescence Après Photoblanchiment (en anglais : Fluorescence Recovery After Patterned Photobleaching - FRAPP) (Harb, 2012). On entend par photoblanchiment l'ensemble des processus par lesquels une molécule perd sa faculté d'émettre de la fluorescence à la suite d'une (forte) excitation lumineuse. Le photoblanchiment produit une zone dont la fluorescence est quasiment nulle. C'est cette propriété qui est mise à profit dans la technique de FRAPP. Ainsi, pour notre étude, nous avons mesuré le coefficient de diffusion des lipides dans des bicouches de surfactant pulmonaire disposées sur des substrats de verre et incubées avec différents types des particules.

Les molécules lipidiques fluorescentes sont initialement réparties de façon homogène dans la phase fluide du surfactant pulmonaire (fond vert). Le photoblanchiment consiste à augmenter

pendant un court instant l'intensité lumineuse du LASER. Les faisceaux lumineux arrivent sur l'échantillon avec une intensité maximale et les molécules fluorescentes éclairées vont être photoblanchies (désactivation du fluorophore). Des franges sont ainsi «gravées» sur la bicouche (Fig.28). Après le blanchiment, l'intensité des faisceaux lumineux est réduite de façon à seulement exciter la fluorescence sur la bicouche. On forme toujours des franges d'interférence dans l'échantillon, mais celles-ci ne «s'impriment» plus. Elles permettent uniquement la lecture du retour de fluorescence par excitation des fluorophores. A l'aide du mouvement oscillant du miroir lié à un actuateur piézo-électrique, les franges du faisceau de lecture passeront par des positions où elles sont en phases avec celles qui sont gravées (l'intensité de fluorescence collectée sera alors maximum) à des positions où elles sont en opposition de phase (l'intensité sera minimum). Cette différence d'intensité donne le contraste. Après le blanchiment, les molécules lipidiques, soumises au mouvement brownien, diffusent dans la bicouche, passant d'une frange à l'autre. Le contraste enregistré diminuera donc avec un temps caractéristique dépendant de la largeur des franges, à partir duquel on déterminera le coefficient de diffusion des molécules lipidiques.

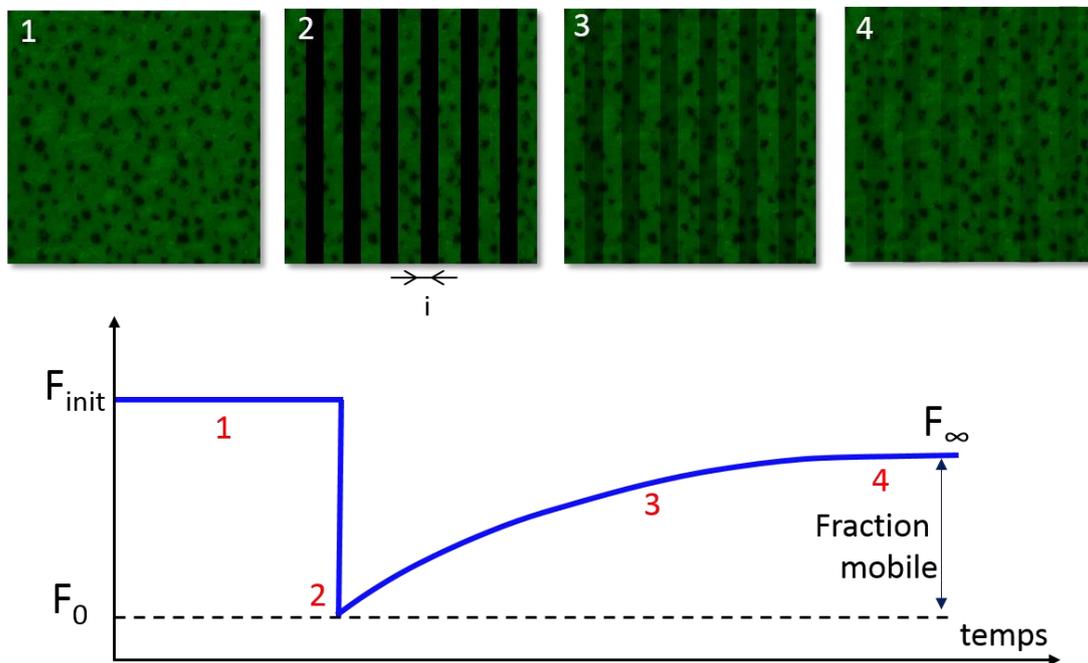


Fig. 28 Principe de la Redistribution de Fluorescence Après Photoblanchiment (FRAP) : images de fluorescence et la courbe type de retour de fluorescence

L'interfrange est donnée par :

$$i = \frac{\lambda}{2 \sin \frac{\theta}{2}} \quad (1.26)$$

où θ est l'angle entre les deux faisceaux incidents.

Les caractéristiques du vecteur d'onde q dans l'espace réciproque sont :

$$q = \frac{2\pi}{i} \quad (1.27)$$

En utilisant la loi de Fick et à partir des courbes de retour de fluorescence, on peut déterminer le temps caractéristique de diffusion. Les courbes de retour de fluorescence sont données par :

$$C(t) = C_{\infty} + (C_0 - C_{\infty}) * e^{-t/\tau} \quad (1.28)$$

où C_0 et C_{∞} correspondent aux contrastes juste après et infiniment longtemps après le photoblanchiment. Le temps caractéristique τ de retour de fluorescence, donne le coefficient de diffusion des lipides par :

$$D = \frac{1}{\tau q^2} \quad (1.29)$$

L'ensemble des valeurs moyennes du coefficient de diffusion D mesuré à 37°C pour les bicouches de surfactant pulmonaire incubé avec différents types de particules est montré sur la figure 29a.

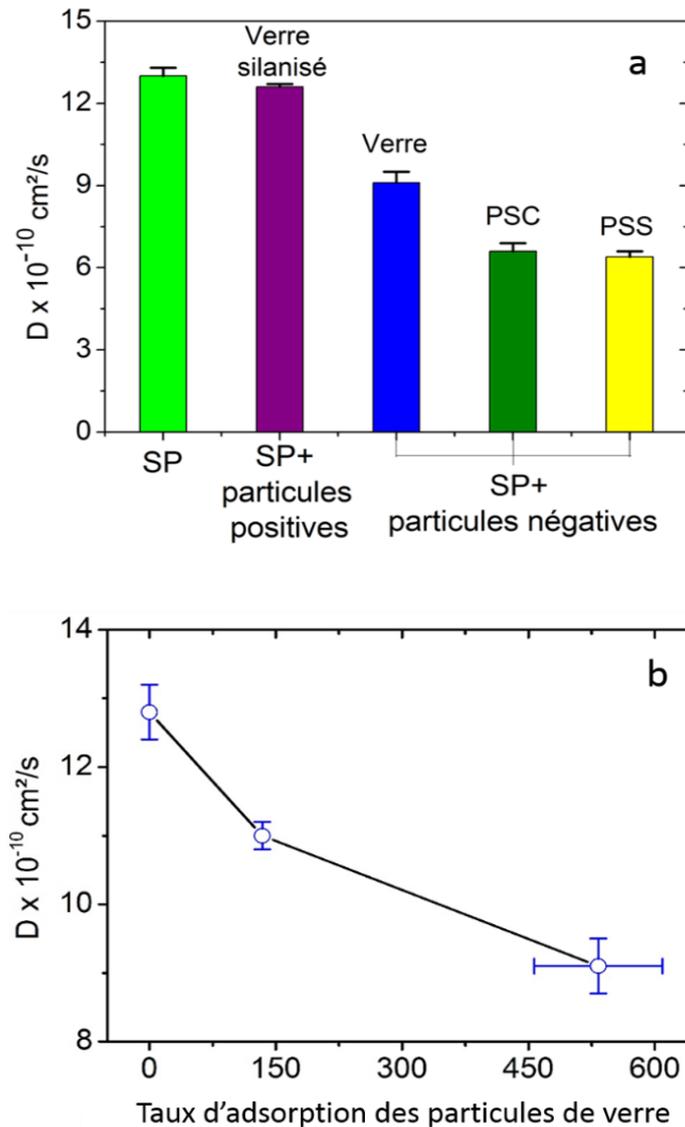


Fig. 29 a : Coefficient de diffusion du surfactant pulmonaire (contenant 1% de marqueur fluorescent NBD-PC) incubé avec différents types de particules. b : Coefficient de diffusion du surfactant pulmonaire (contenant 1% de marqueur fluorescent NBD-PC) en fonction du taux d'adsorption des particules de verre

On observe que :

- le surfactant pulmonaire sans particules a un coefficient de diffusion de $13 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$. Cette valeur est comprise entre la valeur de diffusion de la phase fluide (de l'ordre de $10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$) et la valeur de diffusion de la phase solide (de l'ordre de $10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$) qui ont été mesurées dans autres études (Harb, et al., 2013). Tenant compte du fait que le surfactant pulmonaire est un mélange des lipides en phase fluide (DLPC) et en phase solide (DPPC et DPPS), les valeurs obtenues confirment nos mesures,
- les particules positives ne modifient pas le coefficient de diffusion du surfactant pulmonaire car elles ne s'adsorbent pas,
- les particules négatives, indépendamment de leur nature, diminuent le coefficient de diffusion du surfactant pulmonaire. Cette diminution est due à l'adsorption des particules négatives sur le surfactant pulmonaire,

- la diminution du coefficient de diffusion est directement proportionnelle avec le taux d'adsorption de particules sur le surfactant pulmonaire, comme on peut l'observer dans le cas des particules de verre (Fig.27b).

Les résultats obtenus, qui mettent en évidence la diminution du coefficient de diffusion des molécules lipidiques dans le surfactant pulmonaire lors des interactions avec les particules négatives, confirment l'apparition des zones de condensation. En effet, comme expliqué ailleurs (Wanga, et al., 2008) (Zhang, et al., 2006) (Goertz, et al., 2011), l'adsorption des particules négatives sur les lipides zwitterioniques est accompagné par un allongement de la tête lipidique, permettant aux lipides un arrangement plus ordonné, ce qui conduit à l'apparition des nombreuses zones de condensation.

Dans le cas du surfactant pulmonaire à l'interface air/liquide, ces zones de condensation, initiées lors des interactions avec les particules négatives, favoriseront lors de la compression la formation des domaines condensés plus nombreux mais d'une taille plus petite. Cette diminution de la taille des domaines est la raison principale de la diminution du module d'élasticité du surfactant pulmonaire et par conséquent de son efficacité lors de la respiration.

E.5 Conclusions préliminaires

Dans ce chapitre nous avons exploité le modèle de surfactant pulmonaire mis au point dans le chapitre D pour tester la toxicité des particules d'usure aéroportées modèle. Deux types des particules modèles ont été utilisés : des particules positives et des particules négatives.

Il ressort de ce travail que les particules positives interagissent faiblement avec les structures lipidiques du surfactant pulmonaire, raison pour laquelle aucune modification des propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire n'a été observée.

En revanche, les particules négatives interagissent fortement avec le surfactant pulmonaire, spécialement quand celui-ci se trouve dans un état fluide (pendant l'inspiration). Ces interactions génèrent des changements à une échelle nanométrique au niveau du surfactant pulmonaire (modification de l'angle du dipôle et l'allongement de la tête lipidique) qui favorise un arrangement plus ordonné des lipides, donc qui génère des pointes de condensation locales qui, pendant la compression latérale du surfactant pulmonaire (en expiration), favoriseront la formation des domaines condensés plus nombreux mais d'une taille plus petite. En plus, nous avons montré que la diminution de la taille des domaines est la raison principale de la diminution du module d'élasticité du surfactant pulmonaire. La diminution de l'élasticité se traduit par une perte de l'efficacité du surfactant pulmonaire qui peut conduire à des maladies pulmonaires.

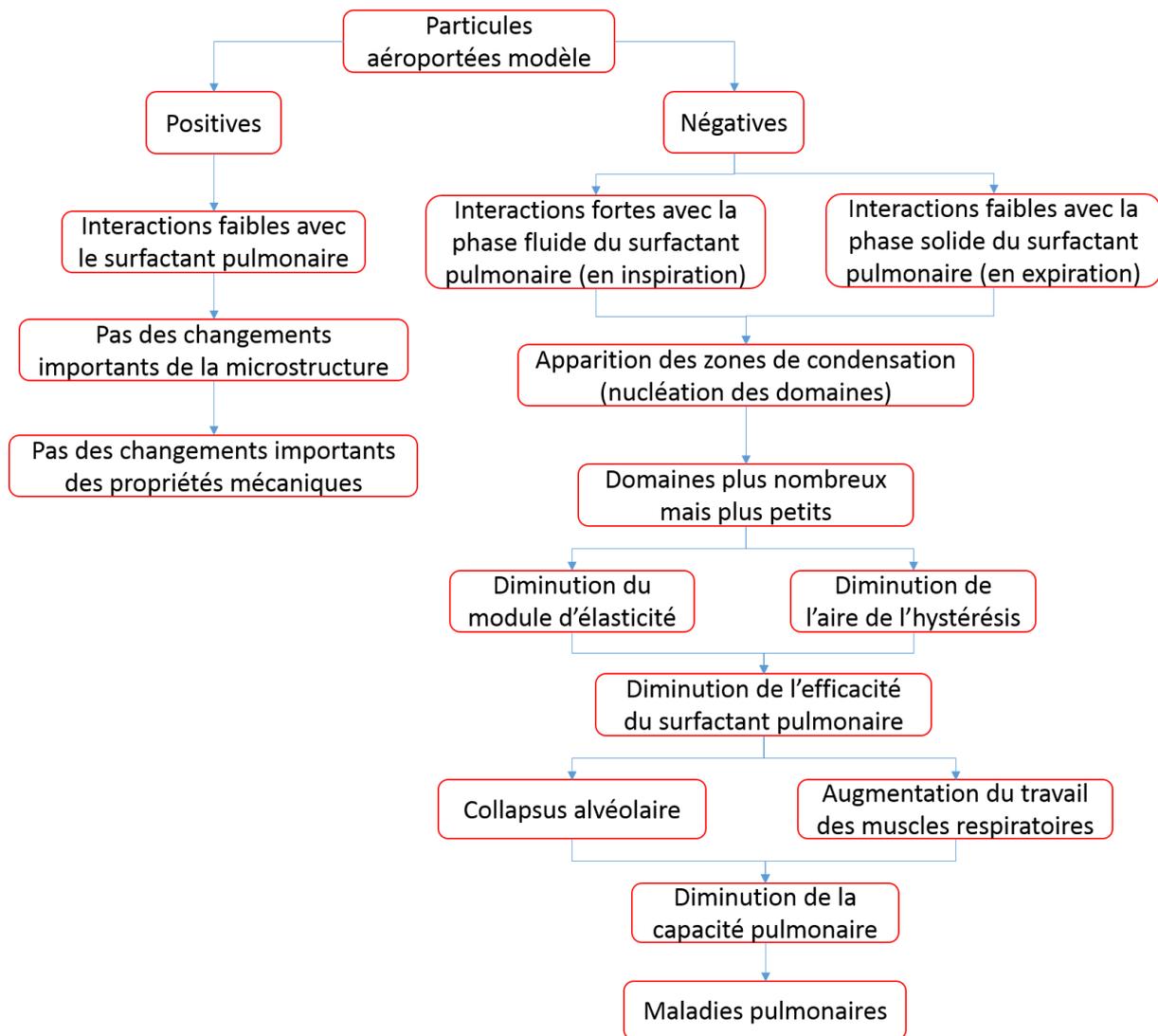


Fig. 30 Diagramme regroupant les effets des particules chargées sur le fonctionnement du surfactant pulmonaire

Travaux cités

- Carl P and Schillers H** Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: data acquisition and processing [Journal] // Pflugers Arch - Eur J Physiol. - 2008. - Vol. 457. - pp. 551-559.
- Farnoud A M and Fiegel J** Low concentrations of negatively charged sub-micron particles alter the microstructure of DPPC at the air-water interface [Journal] // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. - 2012. - Vol. 415. - pp. 320-327.
- Goertz M P [et al.]** Substrate effects on interactions of lipid bilayer assemblies with bound nanoparticle [Journal] // Journal of Colloid and Interface Science. - 2011. - 2 : Vol. 358. - pp. 635-638.
- Guzmán E [et al.]** Influence of silica nanoparticles on phase behavior and structural properties of DPPC—Palmitic acid Langmuir monolayers [Journal] // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. - 2012. - Vol. 413. - pp. 280–287.
- Harb F** These: Etude d'un système biomimétique simple: diffusion brownienne et mobilité électrophoretique d'une protéine membranaire insérée dans une bicouche lipidique supportée [Report] / Aix-Marseille Université. - [s.l.] : Biological Physics., 2012.
- Harb F, Simon A and Tinland B** Ripple formation in unilamellar-supported lipid bilayer revealed by FRAPP [Journal] // The European physical journal. E, Soft matter. - 2013. - 12 : Vol. 36. - pp. 1-7.
- Lai P [et al.]** Real-time imaging of interactions between dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and gelatin based nanoparticles using Brewster angle microscopy [Journal] // Journal of Biomedical Nanotechnology. - 2010. - Vol. 6. - pp. 145-152.
- McNamee C E [et al.]** Interfacial Forces between a Silica Particle and Phosphatidylcholine Monolayers at the Air-Water Interface [Journal] // Langmuir. - 2010. - 18 : Vol. 26. - pp. 14574–14581.
- Mirea D A [et al.]** Role of the biomolecular interactions in the structure and tribological properties of synovial fluid [Journal] // Tribology International. - Vol. 59. - pp. 302-311.
- Stillwell W** An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts [Book]. - [s.l.] : Academic Press, Elsevier, 2013.
- Trunfio-Sfarghiu A-M** These: Modèle bio-tribologique des articulations. Rôle mécanique et physicochimique des assemblages moléculaires du fluide synovial [Report]. - 2006.
- Wanga B [et al.]** Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes [Journal] // PNAS. - 2008. - 47 : Vol. 105. - pp. 18171–18175.
- Yang L and Ning G** Thermodynamics of Charged Nanoparticle Adsorption on Charge-Neutral Membranes: [Journal] // The Journal of Physical Chemistry B. - 2010. - 8 : Vol. 114. - pp. 2749–2754.
- Zhang L and Granick S** How to Stabilize Phospholipid Liposomes (Using Nanoparticles) [Journal] // Nano Letters. - 2006. - Vol. 6. - pp. 694-698.

Conclusions générales

La sécurité routière est assurée entre autres par la production de particules d'usure. Ainsi, près de 20 000 tonnes de garnitures de frein sont usées par an en France, dont 9 000 tonnes sous forme de particules d'usure aéroportées. Ces particules posent des problèmes de santé car leur composition chimique et leur morphologie font qu'elles interagissent avec la paroi alvéolaire entraînant des pathologies.

Dans ce contexte, cette thèse analyse les mécanismes d'interaction des particules d'usure **tribo-compatibles** aéroportées avec le surfactant pulmonaire, c'est-à-dire, la barrière lipidique qui protège la paroi interne des alvéoles pulmonaires et qui contrôle la mécanique respiratoire. Plus particulièrement, cette thèse se concentre sur la compréhension des relations entre les propriétés physico-chimiques de ces particules et leurs effets sur le fonctionnement normal du surfactant pulmonaire, notamment ses propriétés mécaniques qui contrôlent la capacité pulmonaire.

Les moyens expérimentaux *in vivo* étant insuffisants pour étudier ces relations particules-surfactant pulmonaire, nous avons mis au point un modèle *ex vivo*. Ce modèle reproduit d'une part le film de surfactant pulmonaire et d'autre part les mouvements respiratoires. Ainsi, une monocouche de molécules lipidiques qui est le surfactant pulmonaire (~2.5 nm épaisseur) a été déposé à la surface d'un liquide simulant le milieu biologique et sollicitée latéralement à l'aide des deux barrières d'une cuve de Langmuir afin de simuler le mouvement respiratoire. En utilisant différents types de molécules :

- lipides en phase gel zwitterioniques (DPPC),
- lipides en phase gel anioniques (DPPS),
- lipides en phase fluide zwitterioniques (DLPC),
- la protéine KL4 (partie active de la protéine surfactant SP-B)

on a ainsi reproduit la composition du surfactant pulmonaire *in vivo*.

Cette composition confère au surfactant pulmonaire une microstructure en domaines constitués par des lipides plus ordonnés (phase condensée) et repartis dans une masse de lipides désordonnés (phase expansée).

Comme les premiers résultats ont montré que

- (1) l'action des particules est semblable sur un surfactant ayant ou non des protéines
- (2) l'analyse structurale du surfactant avec protéine est impossible

alors, nous avons choisi de reproduire seulement la phase lipidiques du surfactant qui semble la plus importante dans l'interaction particule / surfactant. Ce compromis expérimental, nous a permis de faire une caractérisation complète (structurale, physicochimique et mécanique) de l'interaction particule / surfactant.

Un autre compromis expérimental a été fait pour choisir les particules modèles. En raison de la grande complexité et de la variabilité des particules d'usure aéroportées (voir chapitre A), il est très difficile d'étudier la totalité de leurs interactions avec le surfactant pulmonaire et donc de déterminer leur toxicité. Par conséquent, l'utilisation de particules modèles avec des paramètres bien définis et connus en termes de taille, forme, chimie de surface est vraiment nécessaire pour identifier et comprendre les interactions avec le surfactant pulmonaire. Par conséquent, dans la présente étude on s'est focalisé sur le rôle de la charge de surface des particules sur leurs interactions avec le surfactant pulmonaire. Ce choix a été fait en connaissance de cause, car il est connu qu'une large gamme de particules générées lors du frottement sont électriquement

chargées et que leur dépôt sur les parois des voies respiratoires est influencé par cette charge électrique.

L'étude de la toxicité a été menée en utilisant une approche multi-échelle en exploitant des techniques expérimentales à l'échelle :

- macrométrie qui a permis de mesurer les propriétés mécaniques du surfactant pulmonaire pendant les cycles respiratoires, et a permis ainsi de déterminer l'impact des particules d'usure aéroportées modèles sur la capacité pulmonaire,
- micrométrie (Microscopie d'angle de Brewster) qui a permis de relier les changements mécaniques aux modifications microstructurales du surfactant pulmonaire en interaction avec les particules,
- nanométrie (Redistribution de fluorescence après photoblanchiment, microscopie à force atomique et microscopie de fluorescence) qui a permis d'identifier les mécanismes d'interaction des particules avec les structures lipidiques du surfactant pulmonaire ce qui explique les changements microstructuraux.

Afin de mieux comprendre le lien entre les propriétés mécaniques et la microstructure du surfactant pulmonaire, un modèle numérique simple du surfactant pulmonaire a été créé avec les moyens de la dynamique moléculaire.

Deux **paramètres mécaniques** du surfactant pulmonaire, considérés dans la bibliographie comme des indicateurs essentiels de son efficacité sur la capacité pulmonaire, ont été étudiés afin de déterminer la toxicité des particules. Il s'agit du *module d'élasticité* et de *l'aire de l'hystérésis*.

1. *Module d'élasticité* du surfactant pulmonaire

Pendant les cycles respiratoires, il décrit qualitativement l'efficacité du surfactant pulmonaire, c'est-à-dire la capacité de s'opposer à la diminution du volume de l'alvéole pulmonaire. Cela diminue le travail des muscles respiratoires et empêche le collapsus alvéolaire. Par conséquent, plus le module d'élasticité est élevé plus l'efficacité du surfactant pulmonaire est élevée.

2. *Aire de l'hystérésis* de compression-expansion du surfactant pulmonaire

Pendant les cycles respiratoires, elle est liée aux phénomènes visqueux du surfactant pulmonaire impliqué dans l'élimination des particules, c'est-à-dire la capacité du surfactant pulmonaire de déplacer les particules vers les voies respiratoires supérieures où se trouve le système muco-ciliaire. La diminution de l'aire de l'hystérésis signifie la diminution de la capacité d'élimination de particules, ce qui signifie que les particules vont s'accumuler à l'intérieur de l'alvéole pulmonaire.

Nous avons observé que les interactions des particules avec le surfactant pulmonaire sont fortement dépendantes de leurs charges électriques. Ces interactions déterminent le changement de la conformation des lipides (nano), donc les altérations de la microstructure du surfactant pulmonaire (micro) et par conséquent les diminutions de ses propriétés mécaniques (macro).

Ainsi, les particules chargées positivement interagissent faiblement avec le surfactant pulmonaire, par conséquent elles ne modifient pas de manière significative la microstructure du surfactant pulmonaire donc implicitement son module d'élasticité. Toutefois on a observé une diminution de l'aire de l'hystérésis qui est probablement due à la légère diminution de la taille

des domaines condensés, mais cet aspect nécessite des investigations supplémentaires qui dépassent largement le cadre de cette thèse.

Les particules négatives interagissent fortement avec le surfactant pulmonaire par des interactions de nature électrostatique. Ces interactions induisent des changements de conformation de lipides du surfactant pulmonaire, initialisant ainsi des points de condensation locale qui vont générer lors de la compression (expiration) des nombreux domaines condensés plus petits que ceux obtenus en l'absence de particules.

On a montré expérimentalement, que la diminution de la surface des domaines condensés était la principale raison de la diminution du module d'élasticité du surfactant pulmonaire lors des cycles respiratoires, ce qui a été confirmé aussi en utilisant le modèle numérique. Probablement la diminution de la surface des domaines est également à l'origine de la diminution de l'aire de l'hystérésis respiratoire, mais il est fortement probable qu'il existe aussi d'autres mécanismes impliqués qui nécessitent d'être précisés dans des travaux futurs. En conclusion, l'ensemble des résultats expérimentaux montre que l'électronégativité des particules aéroportées est un des paramètres qui détermine leur "toxicité", car elle induit (i) des changements de conformation des lipides (nano), donc (ii) des altérations de la microstructure du surfactant pulmonaire (micro) et par conséquent (iii) des diminutions de ses propriétés mécaniques (macro). Ces diminutions des propriétés conduisent au collapsus alvéolaire et à la diminution de la capacité respiratoire.

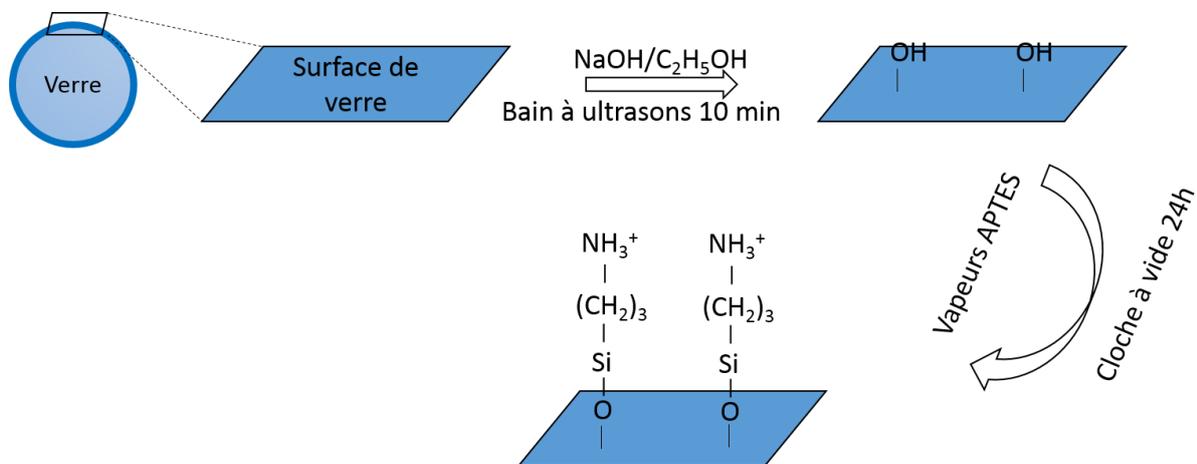
Ces premiers résultats permettront à court terme, d'identifier les autres paramètres significatifs qui caractérisent les actions de particules d'usure aéroportées sur les propriétés mécaniques et physicochimiques des parois alvéolaires. Ceci permettra de connaître leurs effets sur la capacité pulmonaire. Par conséquent, à plus long terme, cette connaissance permettra d'agir sur les éléments du triplet tribologie d'un frein :

- le mécanisme, raideur, répartition des pressions de contact,
- les premiers corps, composition, structure des matériaux en contact,

afin d'accommoder les vitesses dans un troisième corps plus ou moins pulvérulent. Ce troisième corps ayant des propriétés mécaniques et physicochimiques assurant le fonctionnement du frein dans une large plage de conditions de service, ce qui implique un minimum d'éjection de particules d'usure (sécurité tribologique), qui devront être non-toxiques pour le surfactant pulmonaire (sécurité biologique) ; donc des particules tribo-bio-compatibles.

Annexe 1 – Greffage des particules de verre : obtention des particules positives

Pour obtenir les particules de verre positives, les particules de silice de 500 nm et 4 μm diamètre ont été greffées avec de groupements chimiques (3-Aminopropyl)-triéthoxysilane. (APTES). Ces groupements ont été liés de manière covalente aux groupements silanols SiOH présents sur la surface des particules de verre. Pour cela, avant le greffage, les particules de verre ont été nettoyées en utilisant la soude alcoolique qui est un mélange d'éthanol et hydroxyde de sodium pendant 10 min dans un bain à ultrasons. Le rôle de la soude alcoolique est double : d'une part, d'éliminer les éventuelles impuretés sur la surface des particules et d'autre part activer les groupements silanes présentes sur la surface de verre. Un rinçage à l'eau ultra pure a été réalisé pour éliminer les traces de soude alcoolique. Les particules ont été finalement déposées sous forme de fines couches dans une cloche à vide pendant 24h où se trouve également une petite goutte d'APTES.



Le protocole de greffage de l'APTES sur les particules de verre

Le protocole a été vérifié en le répétant sur une plaque de verre (diamètre 12 mm) et en effectuant des mesures d'angle de contact. Nous avons observé une augmentation d'angle de contact de $\sim 0^\circ$ pour le verre nu (fraichement lavé) à $\sim 90^\circ$ pour le verre greffé avec APTES ce qui prouve le greffage.

Annexe 2 – La mesure de la taille des particules par Diffusion dynamique de la lumière⁶⁴

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique d'analyse spectroscopique non destructive permettant d'accéder à la taille de particules en suspension dans un liquide ou de chaînes de polymère en solution de 1 à 500 nm de diamètre environ.

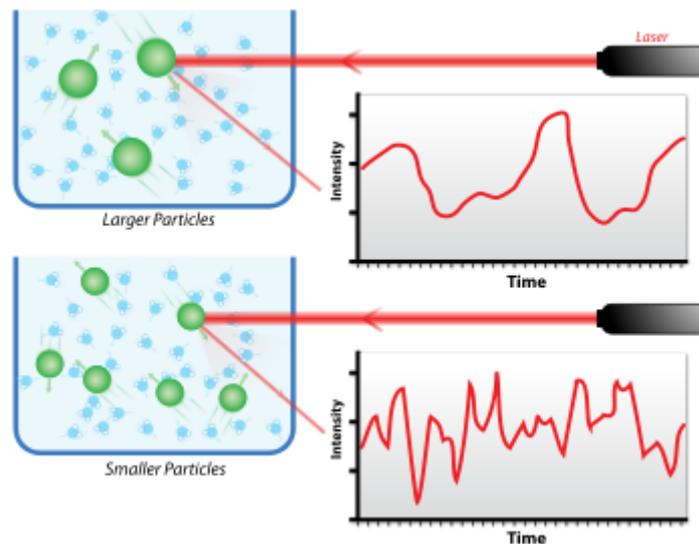


Fig. 1 L'intensité diffusée par des grosses particules (moins mobiles) varie moins vite au cours du temps que pour des petites particules

Principe

Lorsque la lumière d'un laser atteint des petites particules dans une microcuvette, la lumière diffuse dans toutes les directions. Ce phénomène est principalement de la diffusion de Rayleigh, diffusion élastique où les particules sont plus petites que la longueur d'onde considérée. On peut mesurer l'intensité de la lumière diffusée par les particules à un angle considéré (90° typiquement) au cours du temps. Cette dépendance en temps vient du fait que les particules dans un liquide sont soumises au mouvement Brownien à cause de l'agitation thermique. La distance entre diffuseurs (concentration locale) change ainsi sans cesse. Il en résulte des interférences constructives ou destructives et l'intensité totale mesurée contient des informations sur la vitesse de mouvement des particules.

Traitement mathématique

Un traitement mathématique est mis en œuvre. On définit la fonction d'autocorrélation qui permet de comparer le signal mesuré à lui-même, mais avec un petit décalage temporel. Une modélisation graphique permet d'extraire un temps caractéristique de décroissance de cette fonction. Si l'autocorrélation décroît rapidement (taux faible), c'est que le signal mesuré varie rapidement. C'est le cas lorsque les particules se déplacent assez vite, donc qu'elles sont de petites tailles (plus mobiles). L'inverse de ce temps caractéristique (dit temps de relaxation) est lié au coefficient de diffusion des particules par la relation suivante :

$$\frac{1}{t} = 2Dq^2$$

⁶⁴ De Wikipedia-The Free Encyclopedia - 05/12/2014
http://fr.wikipedia.org/wiki/Diffusion_dynamique_de_la_lumi%C3%A8re

avec D le coefficient de diffusion, q le vecteur d'onde et t le temps de relaxation. L'équation de Stokes-Einstein permet alors d'obtenir le rayon hydrodynamique des particules :

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s D}$$

où k_B désigne la constante de Boltzmann et η_s la viscosité du fluide

Annexe 3 – Mesure du potentiel zêta des particules par Électrophorèse Laser Doppler (ELS)⁶⁵

L'électrophorèse laser Doppler (ELS) est une technique utilisée pour mesurer la mobilité électrophorétique des particules en dispersion, ou des molécules en solution. Cette mobilité est souvent convertie en potentiel zêta pour permettre la comparaison entre matériaux dans différentes conditions expérimentales. Le principe physique fondamental utilisé est celui de l'électrophorèse. Une dispersion est introduite dans une cellule contenant deux électrodes. Un champ électrique est appliqué aux bornes des électrodes, et les particules ou molécules ayant une charge électrique, ou de façon plus stricte un potentiel zêta, vont alors migrer vers l'électrode chargée de façon opposée à une certaine vitesse, appelée la mobilité, qui est liée à leur potentiel zêta. La vitesse est mesurée par laser Doppler. Il y a deux façons de mettre cela en œuvre :

- La première est de déterminer le décalage en fréquence, qui permet d'obtenir une distribution de potentiel zêta complète et la seconde, appelée PALS, consiste à mesurer le déphasage.
- La PALS (analyse de la phase de la lumière diffusée) est une méthode plus sensible, mais donne seulement la valeur moyenne du potentiel zêta.



Malvern Zetasizer Nano ZS (gauche) et les cellules (droite) utilisées pour la mesure du potentiel zêta des particules

⁶⁵ De Malvern Instruments - 05/12/2014 - <http://www.malvern.com/fr/products/technology/electrophoretic-light-scattering/>

Annexe 4 – Moyens d'étude des fonctions du surfactant pulmonaire *ex vivo*⁶⁶

Plusieurs méthodes expérimentales sont disponibles pour investiguer les fonctions du surfactant pulmonaire *ex vivo*.

Cuve de Langmuir - Mendenhall, 1972; Notter, Taubold, & Mavis, 1982; Sosnowski, Gradon, & Podgorski, 1997

Bulle oscillante - Egan, Notter, Kwong, & Shapiro, 1983; Enhorning, 1977; Sosnowski, Gradon, & Podgorski, in press; Sosnowski, Gradon, Podgorski, Wrobel, & Pirozynski, 1998

Technique de la bulle captive - Schurch, Bachofen, Goerke, & Green, 1992

Spinning bulle tensiomètre - Chung, Shanks, Hanneman, & Franses, 1990

Tensiomètre par l'anneau du Du Noy - Barrow & Hills, 1979

Techniques optiques - Belorgey, Tchoreloff, Benattar, & Proust, 1991; Pastrana-Rios, Taneva, Keough, Mautone, & Mendelsohn, 1995

⁶⁶ Tomasz R. Sosnowski Albert Podgorski, Assessment of the Pulmonary Toxicity of Inhaled Gases and Particles with Physicochemical Methods, INTERNATIONAL JOURNAL OF OCCUPATIONAL SAFETY AND ERGONOMICS 1999, VOL. 5, NO. 3, 431-447

Annexe 5 – Mesure de la pression de surface^{67,68}

La plus importante caractéristique du comportement surfacique du surfactant pulmonaire est la pression de surface qui est lié à la tension de surface. La pression de surface, notée π , est l'équivalent bidimensionnel de la pression en 3-dimension.

La tension superficielle est un phénomène d'augmentation de l'énergie à la surface d'un fluide et qui en augmente localement la cohésion. Cet effet permet par exemple aux insectes de marcher sur l'eau, à un objet léger de se maintenir à la surface d'un liquide, à la rosée de ne pas s'étaler sur les pétales de fleurs, et explique la capillarité. La tension de surface est la force (exprimée en mN/m) qui se manifeste à la surface d'un liquide parce que les interactions entre les molécules de liquide sont beaucoup plus importantes que les interactions entre le liquide et le gaz. La conséquence est que la surface de liquide tend à être la plus petite possible.

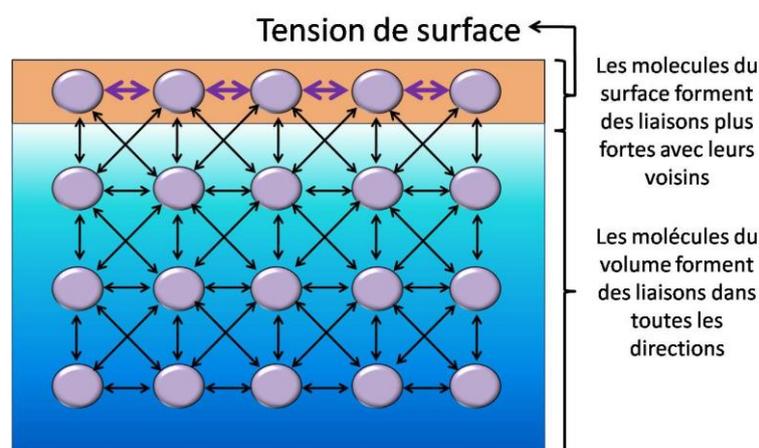


Fig. 1 Les origines de la tension de surface

Ainsi, si on considère la configuration expérimentale de la fig. 2, la tension de surface peut être définie comme la force sur l'unité de longueur nécessaire pour maintenir la glissière en place et pour équilibrer la force tensionnelle de surface qui a tendance à diminuer la surface du liquide (1). Ainsi, on peut écrire :

$$F = -2 * \gamma * L$$

Le terme 2 vient du fait que dans ce cas, le film a deux côtés, dont chacun contribue également à la force.

⁶⁷ Wikipedia - The Free encyclopedia: http://fr.wikipedia.org/wiki/Tension_superficielle

⁶⁸ Butt, H.-J.; Graf, K.; Kappel Physics and Chemistry of Interfaces, 2nd Edition (Wiley-VCH: Weinheim 2006)

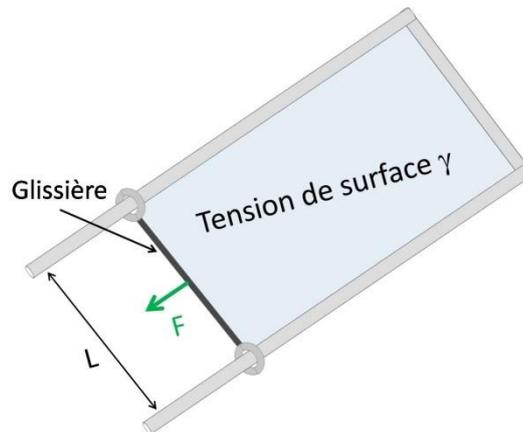


Fig. 2 Configuration expérimentale pour définir la tension de surface

Pour aller plus loin, si on considère un récipient qui contient un liquide avec la tension de surface γ_0 , sur laquelle on dépose une couche de surfactant qui a la tension de surface γ , la force nécessaire pour maintenir la glissière en place devient (Fig. 3):

$$F = -(\gamma_0 - \gamma) * L \quad \text{d'où :}$$

$$\Pi = F/L = \gamma_0 - \gamma$$

Π est la pression latérale dans la couche de surfactant, appelé aussi pression de surface.

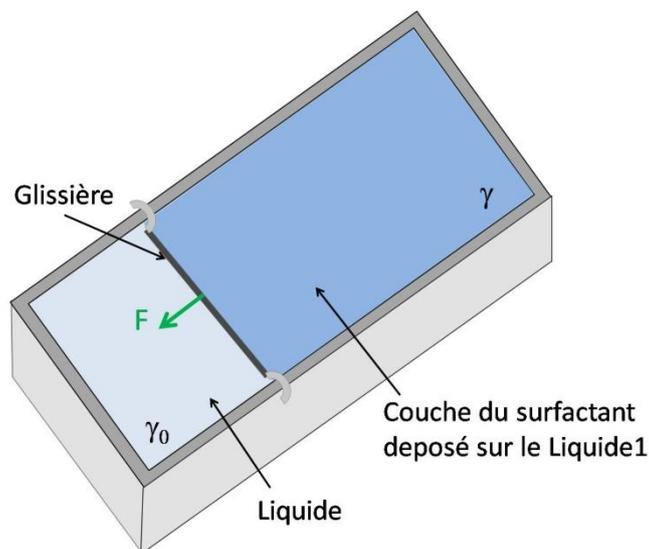


Fig. 3 Configuration expérimentale pour définir la pression de surface

Il existe plusieurs moyens de mesurer la tension de surface du surfactant et remonter ensuite à la pression de surface, dont le plus utilisé est la plaque de Wilhelmy.

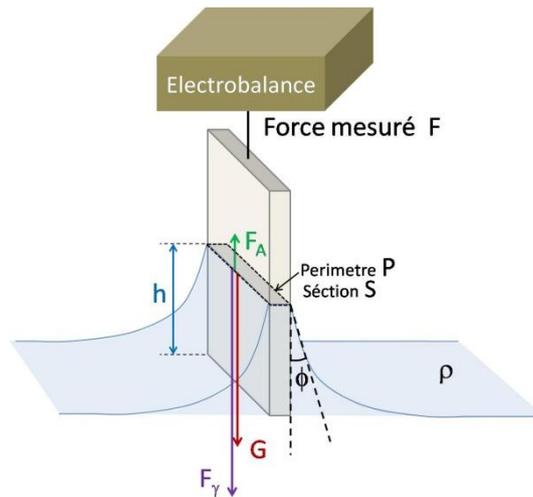


Fig. 4 Mesure de la pression de surface par la plaque de Wilhelmy

Elle est constituée d'une plaque fine d'environ quelques centimètres carrés. La plaque est souvent fabriquée à partir de papier filtre, du verre ou du platine qui peut être rendue rugueuse pour assurer un mouillage complet. En effet les résultats expérimentaux sont indépendants du matériau utilisé tant que le matériau est mouillé par le liquide. La plaque est liée à une électrobalance par l'intermédiaire d'un fil. La force exercée sur la plaque est mesurée par l'électrobalance et elle est utilisée pour mesurer la tension, puis la pression de surface.

$$F = G + F_y - F_A$$

$$F = (m * g) + (\gamma * P * \cos \Phi) - (S * h * \rho * g)$$

m = masse de la plaque

g = accélération gravitationnelle

γ = tension de surface du liquide

P = périmètre de la section de la plaque

ϕ = angle du ménisque

S = section de la plaque

h = hauteur de la région immergée de la plaque

ρ = densité du liquide

Pour information, des valeurs typiques des tensions de surface de certains liquides sont données dans le tableau suivant^{69,70}.

Liquide	Température (°C)	Tension de surface γ ($10^{-3} \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$)
Acide acétique	20	27,6
Acide acétique (40,1 %) + Eau	30	40,68
Acide acétique (10,0 %) + Eau	30	54,56
Acétone	20	23,7
Diéthyl éther	20	17,0
Éthanol	20	22,27
Éthanol (40 %) + Eau	25	29,63
Éthanol (11,1 %) + Eau	25	46,03
Glycérol	20	63
Isopropanol	20	21,7
Mercure	15	487
Mercure	20	436
Méthanol	20	22,6
Octane	20	21,8
Eau	0	75,64
Eau	20	72,8
Eau	25	71,97
Eau	37	70
Eau	50	67,91
Eau	100	58,85
Surfactant pulmonaire	37	25
Plasma sanguine	37	73

⁶⁹Wikipedia - The Free encyclopedia: http://fr.wikipedia.org/wiki/Tension_superficielle#cite_note-2

⁷⁰ Henri Broch, Polycopié de mécanique des fluides, v 3.3

Annexe 6 - Le marquage avec l'annexine V fluorescente

Principe :

- L'annexine a une forte affinité pour ces phosphatidylsérines (PS), un composant du surfactant pulmonaire

Matériel :

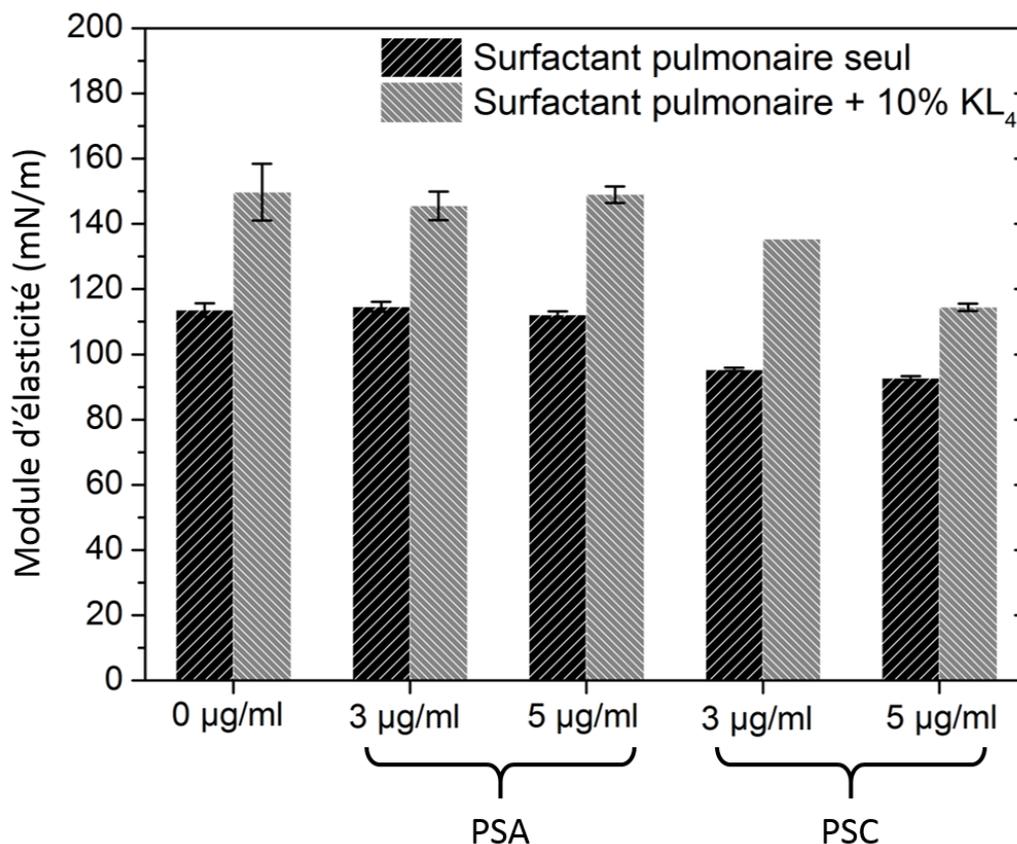
- Annexine Alexa-Fluor 555 (Ref. A35108 Lifetechnologies)
- Tampon annexine : 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM Hepes(PM=238)/NaOH pH 7,4 (pour 200 ml: 1,636 g NaCl, 110 mg CaCl₂ et 476 mg d'Hepes)
- Surfactant pulmonaire fluorescent (NBD-PC) déposé sous forme de bicouche sur une plaque de verre

Protocole :

- Changer le milieu d'hydratation du surfactant pulmonaire avec le tampon annexine
- Ajout 5 μ l d'Annexine V pour chaque 100 μ l milieu d'hydratation du surfactant pulmonaire
- Laisser incuber pour 15 min
- Rincer avec le tampon annexine plusieurs fois (minimum 10 fois)
- Visualisation en microscopie confocale en utilisant les canaux appropriés (488 nm pour le NBD-PC et 555 pour l'Annexine Alexa-Fluor 555)

Annexe 7 - Action de particules positives et négatives sur le modèle de surfactant pulmonaire + KL₄

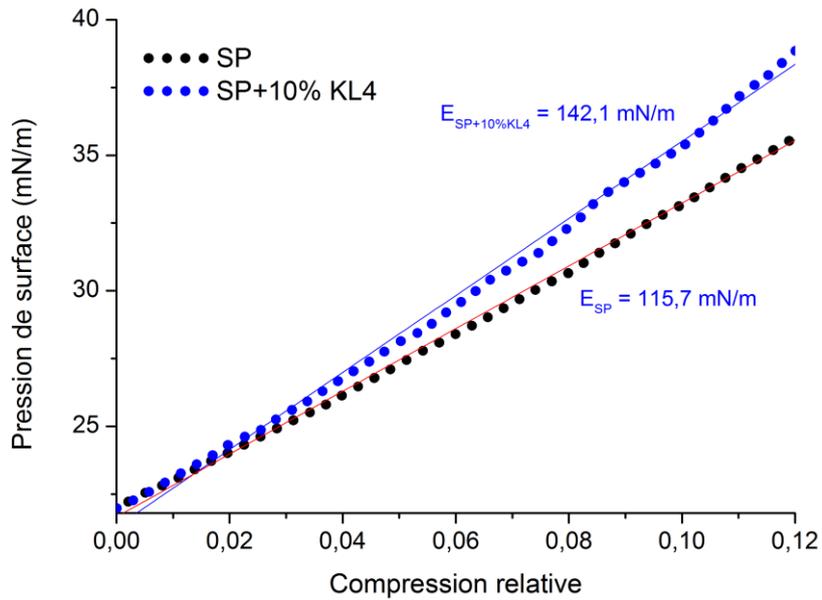
Nous avons étudié l'action de particules d'usure aéropartées positives et négatives sur le modèle de surfactant pulmonaire contenant 90% lipides et 10% protéine KL₄. Les résultats obtenus montrent que l'action des particules est semblable sur un surfactant ayant ou non des protéines. Ainsi, les particules positives (PSA) n'affectent pas de manière significative le module d'élasticité du surfactant pulmonaire, tandis que les particules négatives (PSC) diminuent son module d'élasticité et donc la capacité pulmonaire.



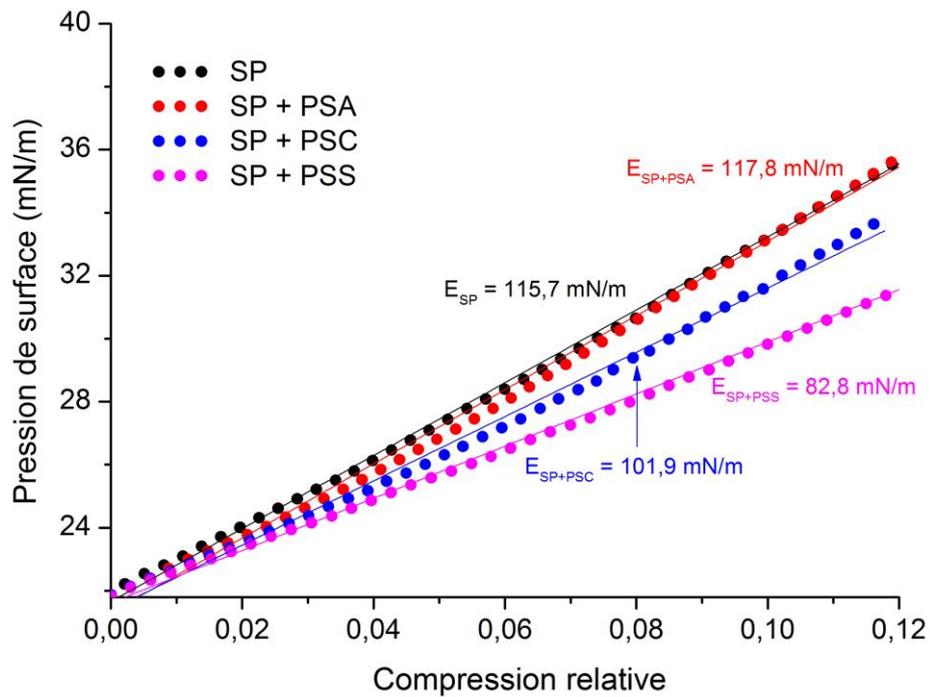
Comme l'utilisation de cette protéine rend impossible la visualisation BAM, par la suite nous avons choisi de reproduire seulement la phase lipidique qui semble la plus importante dans l'interaction directe surfactant / particules. Ce compromis expérimental nous a permis de faire une caractérisation complète (structurale, physicochimique et mécanique) de l'interaction particule / surfactant.

Annexe 8 – Compression du surfactant pulmonaire (exemple de courbes)

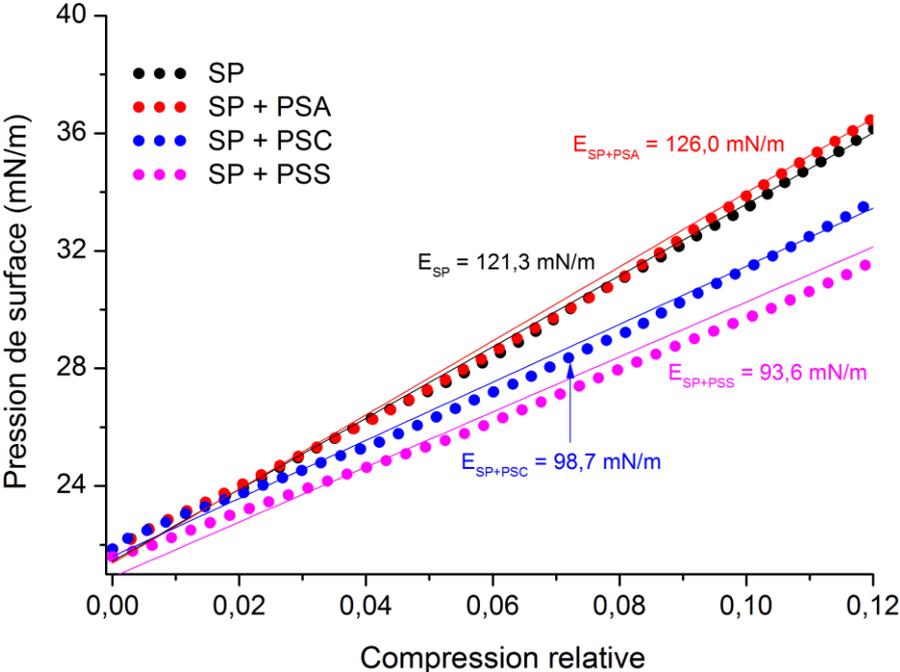
8.1 En présence de la protéine KL4 (fréquence de sollicitation 0.010 Hz) :



8.2 En présence de particules (fréquence de sollicitation 0.010 Hz) :



8.3 En présence de particules (fréquence de sollicitation 0.036 Hz) :



FOLIO ADMINISTRATIF

THÈSE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL
DES SCIENCES APPLIQUÉES DE LYON

NOM : MUNTEANU	DATE de SOUTENANCE : 27/04/2015
Prénoms : Bogdan	
TITRE : Actions de particules d'usure aéroportées sur les propriétés mécaniques et physicochimiques des «films» de surfactant pulmonaire. Conséquences sur la conception de particules tribo-bio-compatibles.	
NATURE : Doctorat	Numéro d'ordre : 20151SAL0034
Ecole doctorale : MEGA	
Spécialité : Biomécanique	
<p>RESUME : Paradoxalement, la sécurité routière est assurée entre autre par la production de particules d'usure ! Ainsi, près de 20 000 tonnes de garnitures de frein sont usées par an en France, dont 9 000 tonnes sous forme de particules d'usure aéroportées. Ces particules posent des problèmes de santé car leur composition chimique et leur morphologie font qu'elles interagissent avec la paroi alvéolaire entraînant des pathologies. Au cours de ces pathologies la phase la plus étudiée est la phase inflammatoire qui s'installe une fois que la particule a passé la première barrière de protection qui est le film de surfactant pulmonaire. En revanche, très peu d'études portent sur l'interaction directe des particules aéroportées avec le film de surfactant pulmonaire à cause de difficultés liées aux résolutions des moyens d'investigations cliniques. Alors-que ces études sont d'un intérêt fondamental puisque, de par ses propriétés physicochimiques de surfactant, ce film contrôle la mécanique respiratoire donc la capacité pulmonaire.</p> <p>Dans ce contexte, cette thèse analyse les mécanismes d'action de particules d'usure aéroportées modèles sur les propriétés physicochimiques et mécaniques des parois alvéolaires et plus particulièrement du film de surfactant pulmonaire. Pour cela, un modèle ex vivo de paroi alvéolaire reproduisant la composition, la microstructure du surfactant ainsi que les sollicitations mécaniques pendant les cycles respiratoires, a été mis au point. L'utilisation de ce modèle et les mesures associées ont permis d'élaborer une démarche d'identification des paramètres significatifs des particules qui déterminent leurs interactions avec le film de surfactant pulmonaire. Cela a permis de montrer que l'électronégativité des particules aéroportées est l'un des paramètres significatifs qui induit des changements couplés à différentes échelles, qui vont de la conformation moléculaire (nano), à la microstructure (micro) et aux propriétés mécaniques (macro) de la paroi alvéolaire, conduisant à la diminution de la capacité respiratoire.</p> <p>Ce modèle et les premiers résultats permettront à court terme, d'identifier les autres paramètres significatifs qui caractérisent les actions de particules d'usure aéroportées sur les propriétés mécaniques et physicochimiques des parois alvéolaires. Ceci permettra de connaître leurs effets sur la capacité pulmonaire. Par conséquent, à plus long terme, cette connaissance permettra de modifier les matériaux en contact et leurs conditions de frottement pour générer des particules satisfaisant les exigences tribologiques et biologiques, donc tribo-bio-compatibles.</p>	
MOTS-CLÉS : tribo-compatibilité, bio-compatibilité, particules aéroportées, surfactant pulmonaire, phospholipides.	
Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (LaMCoS), INSA – Lyon, CNRS UMR5259 18-20 rue des Sciences F69621 Villeurbanne Cedex FRANCE http://lamcos.insa-lyon.fr/	
Directeur de thèse: Yves Berthier, Co-directeur de thèse : Ana-Maria Sfarghiu	
Président de jury : Claude Verdier	
Composition du jury : Thierry Charitat, Yves Dubief, Claude Verdier, Bernard Tinland, Jean-Paul Rieu, Ana-Maria Sfarghiu, Yves Berthier, Michel Vincent (invité)	