



**HAL**  
open science

# Candida albicans sur puce : approche biomécanique de la plasticité morphogénétique de *C. albicans*

Lucie Albert

► **To cite this version:**

Lucie Albert. Candida albicans sur puce : approche biomécanique de la plasticité morphogénétique de *C. albicans*. Biophysique [physics.bio-ph]. Université PSL (Paris Sciences & Lettres), 2022. Français. NNT : . tel-04038746

**HAL Id: tel-04038746**

**<https://laas.hal.science/tel-04038746>**

Submitted on 21 Mar 2023

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

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



**THÈSE DE DOCTORAT**  
**DE L'UNIVERSITÉ PSL**

Préparée à l'Institut Curie

***Candida albicans* sur puce : approche biomécanique de la  
plasticité morphogénétique de *C. albicans***

Soutenue par

**Lucie ALBERT**

Le 16 décembre 2022

École doctorale n°564

**Physique en Île-de-France**

Spécialité

**Physique**

Composition du jury :

Nicolas MINC

Directeur de recherche, Institut Jacques  
Monod

*Président et rapporteur*

Yohan DAVIT

Chargé de recherche, Institut de Méca-  
nique des Fluides de Toulouse

*Rapporteur*

Florence CHAPELAND-LECLERC

Maître de conférence, Université Paris  
Cité

*Examinatrice*

Angela TADDEI

Directrice de recherche, Institut Curie

*Examinatrice*

Catherine VILLARD

Directrice de recherche, Université Paris  
Cité

*Directrice de thèse*

Morgan DELARUE

Chargé de recherche, LAAS-CNRS

*Co-directeur*







# Table des matières

<b>Contexte du projet</b>	<b>5</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>7</b>
1.1 <i>Candida albicans</i> , un pathogène opportuniste . . . . .	7
1.1.1 De la colonisation commensale à l'infection . . . . .	7
1.1.2 Polymorphisme chez <i>C. albicans</i> . . . . .	9
1.1.3 Polymorphisme et pathogénicité . . . . .	11
1.1.4 Mécanismes d'invasion et de virulence . . . . .	14
1.2 Facteurs physico-chimiques modulant la morphogénèse . . . . .	18
1.2.1 Circuit de signalisation contrôlant la morphogénèse . . . . .	19
1.2.2 La température . . . . .	23
1.2.3 Le pH et la voie Rim101 . . . . .	24
1.2.4 Facteurs de croissance et oxygène . . . . .	26
1.2.5 Le <i>quorum-sensing</i> . . . . .	28
1.3 Croissance et division cellulaire . . . . .	33
1.3.1 Concepts généraux de croissance et division . . . . .	33
1.3.2 Mécanismes de croissance des hyphes . . . . .	40
1.4 Liens entre croissance et contraintes mécaniques chez les levures . . . . .	46
1.5 Est-ce-que la mécanique favorise la virulence de <i>C. albicans</i> ? . . . . .	58
1.5.1 Dans quels contextes la mécanique pourrait-être impliquée? . . . . .	58
1.5.2 Quelles seraient les voies d'intégration d'un stress mécanique chez <i>C. albicans</i> ? . . . . .	61
<b>Résumé</b>	<b>65</b>
<b>2 Dynamique d'initiation et de maintenance hyphale en croissance libre</b>	<b>67</b>
2.1 Introduction . . . . .	67
2.2 Dynamique de l'initiation sous stress inductif continu . . . . .	67
2.2.1 Présentation du rapporteur $P_{HWP1} - GFP$ . . . . .	67
2.2.2 Pourcentage d'hyphes dans la population sous sérum à 37°C . . . . .	68
2.3 Dynamique <i>cellule-unique</i> de l'expression du rapporteur durant l'initiation . . . . .	69
2.3.1 Acquisition et résultats bruts . . . . .	69
2.3.2 Modèle décrivant l'expression temporaire du rapporteur suivie d'une décroissance . . . . .	70
2.4 Dynamique <i>cellule-unique</i> de l'expression du rapporteur durant la maintenance . . . . .	73
2.4.1 Intensité de fluorescence apicale durant l'extension de l'hyphe . . . . .	73
2.4.2 L'expression du rapporteur est corrélée à la vitesse d'expansion de l'hyphe . . . . .	75
2.5 Effet du farnésol sur l'initiation et la maintenance sous sérum à 37°C . . . . .	78

2.5.1	Le farnésol réprime l'initiation hyphale dans la population . . . . .	78
2.5.2	Le farnésol ralentit la production de Hwp1 durant l'expansion hyphale . . . .	79
2.6	Conclusion et perspectives . . . . .	80
2.6.1	Conclusion . . . . .	80
2.6.2	Perspectives . . . . .	81
<b>3</b>	<b>Impact de la pression de croissance sur la probabilité d'initiation hyphale</b>	<b>83</b>
3.1	Méthode expérimentale pour l'application de contraintes mécaniques sur les cellules	84
3.1.1	Principe du dispositif microfluidique et choix des paramètres physico-chimiques	84
3.1.2	Développement de pression induite par la croissance de cellules sous confinement . . . . .	85
3.2	La pression induite par la croissance module l'initiation d'hyphes chez <i>C. albicans</i> .	86
3.2.1	Observation des inductions hyphales dans la puce microfluidique . . . . .	87
3.2.2	Normalisation du nombre d'inductions : taux d'induction spatio-temporel .	88
3.3	Le farnésol comme candidat dans la modulation du taux d'induction sous pression de croissance . . . . .	91
3.3.1	Effet de la vitesse de rinçage de milieu sur le taux d'induction . . . . .	91
3.3.2	Effet de la limitation de la sécrétion de farnésol sur le taux d'induction . . . .	92
3.4	Un modèle spatio-temporel pour décrire le taux d'induction sous pression de croissance . . . . .	93
3.4.1	Hypothèses du modèle . . . . .	93
3.4.2	Modèle décrivant la concentration locale de farnésol endogène sous pression de croissance . . . . .	95
3.4.3	Prédictions théoriques du modèle . . . . .	98
3.5	Ajustement des paramètres du modèle sur l'ensemble des expériences contrôles . .	101
3.5.1	Ajustement du modèle sur le taux temporel . . . . .	101
3.5.2	Ajustement du modèle sur le taux spatial . . . . .	102
3.5.3	Bilan sur l'ajustement du modèle . . . . .	103
3.6	Estimation de la résistance hydrodynamique théorique du poreux constitué de cellules	104
3.6.1	Approximation de Kozeny-Carman . . . . .	104
3.6.2	La résistance du poreux est théoriquement négligeable pour les porosités mesurées . . . . .	105
3.7	Prédictions du modèle . . . . .	106
3.7.1	Prédictions du modèle lorsque le rinçage est augmenté . . . . .	106
3.7.2	Prédiction de l'augmentation du taux d'induction temporel lorsque le taux de sécrétion de farnésol est limité . . . . .	108
3.7.3	Bilan et limitations générales des prédictions du modèle . . . . .	110
3.8	Conclusion et perspectives . . . . .	111
3.8.1	Conclusion . . . . .	111
3.8.2	Calibration et questionnement du modèle proposé . . . . .	112
3.8.3	Probabilité d'induction après relaxation de la pression . . . . .	115
<b>4</b>	<b>Impact de la pression de croissance sur l'initiation et la maintenance hyphale</b>	<b>119</b>
4.1	Introduction . . . . .	119
4.2	Dynamique d'expression du rapporteur durant l'initiation sous pression de croissance	119
4.2.1	L'expression du rapporteur est temporaire sous pression de croissance . . . .	119
4.2.2	Pas de variation des taux de dégradation avec la pression de croissance . . . .	121

4.2.3	Modulation de la fenêtre temporelle et du taux de production sous pression de croissance . . . . .	121
4.3	Impact de la pression sur la maintenance de la croissance hyphale . . . . .	123
4.3.1	Principe de la mesure et résultats bruts . . . . .	123
4.3.2	La pression limite le taux de production de Hwp1 et la croissance apicale des hyphes . . . . .	125
4.4	Comparaison des dynamiques de production de Hwp1 entre la phase d'initiation et de maintenance . . . . .	127
4.4.1	Les taux de production nets nominaux restent comparables entre initiation et maintenance . . . . .	127
4.4.2	La force d'activation du promoteur semble régulée durant l'initiation . . . . .	127
4.5	Comparaison à la dynamique d'expression d'un gène constitutif . . . . .	127
4.5.1	Principe et objectif de l'étude d'un autre promoteur . . . . .	127
4.5.2	La dynamique d'expression diffère selon le promoteur étudié . . . . .	129
4.6	La limitation de croissance sous compression mécanique diffère selon le morphotype	130
4.6.1	La croissance cellulaire diminue avec la pression tandis que l'encombrement intracellulaire augmente . . . . .	130
4.6.2	L'écart d'encombrement nominal entre chaque morphotype pourrait expliquer la différence des dynamiques de croissance sous compression . . . . .	133
4.7	Conclusion et perspectives . . . . .	134
4.7.1	Conclusion . . . . .	134
4.7.2	Prise en compte de la dilution dans le modèle d'induction de <i>HWPI</i> . . . . .	134
4.7.3	Maintien de la croissance hyphale si la pression est relaxée . . . . .	136
<b>5</b>	<b>Modulation de la morphogénèse par couplage mécano-chimique : le cas du pH</b>	<b>141</b>
5.1	Répartition spatio-temporelle des inductions d'hyphes à pH5,5 et pH 7 sous pression de croissance . . . . .	142
5.1.1	Les inductions d'hyphes adviennent avant l'arrivée à confluence à pH 7,0 . . . . .	142
5.1.2	Impact du renouvellement du milieu de culture sur la probabilité d'induction d'hyphes . . . . .	144
5.1.3	Impact d'un changement de pH sur la probabilité d'induction d'hyphes . . . . .	145
5.2	Modulation du pH sur la dynamique d'initiation et de maintenance hyphale en <i>cellule-unique</i> . . . . .	146
5.2.1	Modulation de la dynamique d'expression de <i>HWPI</i> par le pH durant l'initiation	146
5.2.2	La pression module la dynamique d'expression de <i>HWPI</i> durant l'initiation à pH7 . . . . .	147
5.2.3	La dynamique de maintenance hyphale semble indépendante du pH . . . . .	148
5.3	Conclusion et perspective . . . . .	149
5.3.1	Conclusion . . . . .	149
5.3.2	Perspective . . . . .	150
	<b>Conclusion et perspective générale</b>	<b>153</b>
<b>6</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>157</b>
6.1	Culture cellulaire . . . . .	157
6.1.1	Souches utilisées . . . . .	157
6.1.2	Milieux de culture utilisés . . . . .	158

6.1.3	Culture microbiologique . . . . .	158
6.2	Dispositifs microfluidiques . . . . .	158
6.2.1	Principe des puces microfluidiques utilisées . . . . .	158
6.2.2	Les étapes de fabrication des puces . . . . .	161
6.2.3	Utilisation des puces microfluidiques . . . . .	167
6.3	Analyse d'images . . . . .	170
6.3.1	Mesure de la pression développée par les cellules dans les chambres . . . . .	170
6.3.2	Mesures de fluorescence émise par l'expression de GFP cytoplasmique . . . . .	171
	<b>Bibliographie</b>	<b>174</b>





# Contexte du projet

De plus en plus d'études en mécanobiologie montrent aujourd'hui l'importance de la mécanique dans les processus biologiques, notamment dans des contextes pathologiques comme le cancer. Cette nouvelle approche à l'interface entre physique et biologie s'étend désormais à de nombreuses questions sur des phénomènes biologiques variés. Comment la taille moyenne d'une cellule est-elle conservée? Est-ce que la mécanique module le type cellulaire durant la différenciation des cellules souches au sein des embryons? Quelles contraintes mécaniques rencontrent les cellules cancéreuses dans le corps humain, et comment s'y adaptent-elles? La mécanobiologie adresse ainsi des problématiques concrètes de santé, mais aussi plus fondamentales, sur le fonctionnement du vivant. C'est aussi le cas des deux chercheurs à l'initiative de ce projet, qui questionnent des phénomènes biologiques au travers d'approches et de méthodes dérivant de la physique.

Catherine Villard est directrice de recherche au Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain (Paris Cité). Elle s'intéresse depuis de nombreuses années à des questions reliant formes et fonctions cellulaires. Les travaux de recherche de Catherine Villard interrogent l'adaptation du phénotype cellulaire à l'environnement physique rencontré, la ré-orientation de la croissance en réponse au confinement spatial ou encore la récupération morphologique suite à l'application d'une contrainte mécanique. En particulier, elle a mené plusieurs études sur la croissance des neurones et plus récemment des hyphes de *Candida albicans*. Bien que très éloignés dans leur fonctionnement biologique, ces organismes présentent des similitudes dans leur mode de croissance qui est très polarisée, et leur plasticité de phénotype en réponse à des contraintes physico-chimiques et mécaniques.

Morgan Delarue est chargé de recherche au Laboratoire d'Architecture et d'Analyse des Systèmes du CNRS (Toulouse). Il a débuté ses recherches en biophysique, en questionnant les effets que peut avoir un stress compressif sur la progression de tumeurs cancéreuses. Il a ensuite étendu ses travaux à l'étude de l'impact du confinement spatial sur la physiologie chez différents types cellulaires, aussi variés que les cellules cancéreuses humaines, les levures, ou les bactéries. Morgan Delarue s'intéresse à la fois aux réponses spécifiques à la mécanique, au travers de voies moléculaires d'intégration et de transduction du stress, mais également universelles, via la modulation des paramètres physiques. Cette modulation biophysique pourrait être commune à tous ces types cellulaires, en particulier via la modulation de l'encombrement macromoléculaire et des propriétés rhéologiques.

Les deux initiateurs de ce projet interrogent donc des problématiques reliant mécanique et croissance notamment avec des outils microfluidiques dans divers types cellulaires.

La levure *Candida albicans* en particulier permet d'adresser des questions fondamentales reliant plasticité du phénotype et propriétés biophysiques des cellules. En effet, cet organisme présente différents "morphotypes" auquel il accède de manière réversible et dont les plus étudiés sont la forme "levure" et "hyphes" (filament). Par des approches différentes mais complémentaires, Ca-

therine Villard et Morgan Delarue ont suggéré dans des travaux préliminaires que la contrainte mécanique modulait le phénotype et le mode de croissance de *Candida*.

D'une part, les travaux de doctorat d'Elodie Couttenier sous la direction de C. Villard, C. d'Enfert et S. Bachellier-Bassi (Institut Pasteur) ont exploré les propriétés mécaniques de la forme hyphale de *Candida* à l'aide d'outils microfluidiques. Elodie a en particulier mesuré la rigidité de la paroi cellulaire des hyphes via leur module de flexion sous l'application d'une force hydrodynamique. Elle a également montré que la croissance dirigée du phénotype "hyphe" de *Candida* dépendait du confinement spatial et de la rigidité du substrat, en présentant des mouvements sinusoïdaux ou hélicoïdaux. D'autre part, Morgan Delarue a observé que la rigidité du substrat module le phénotype adopté par des colonies *C. albicans*. Il a également montré dans une précédente étude que les cellules développent de la pression mécanique lorsqu'elles prolifèrent sous confinement spatial. Cette pression induite module en retour la croissance cellulaire.

A partir de ces différents travaux, C. Villard et M. Delarue ont proposé en 2019 un nouveau projet collaboratif entre l'IPGG et le LAAS, qui a été financé par le programme "80 Prime" du CNRS. C'est dans ce cadre interdisciplinaire que s'inscrivent mes travaux de thèse, à l'interface entre biologie, physique et technologie. L'objectif premier et inédit de ce projet est d'étudier l'impact de la mécanique, en particulier du confinement spatial et de la compression, sur la transition entre les différents phénotypes de *Candida albicans*. Pour cela, je m'appuierai sur des outils génétiques et microfluidiques développés par les acteurs du projet, et nous proposerons une approche quantitative avec le développement de modèles, pour décrire les comportements biophysiques observés.

Je vais commencer par introduire les différents aspects biologiques de *C. albicans* qui sont décrits dans la littérature et sur lesquels nous nous sommes appuyés pour mener cette étude.

# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 *Candida albicans*, un pathogène opportuniste

#### 1.1.1 De la colonisation commensale à l'infection

La levure *C. albicans*, du genre ascomycète, prolifère quasi-exclusivement chez les mammifères, dont les humains, en tant que commensal<sup>1</sup>. Depuis sa découverte il y a environ 200 ans, ce pathogène opportuniste prend une place grandissante dans les études épidémiologiques. Aujourd'hui *C. albicans* est le 4<sup>ème</sup> micro-organisme à l'origine d'infections nosocomiales aux États-Unis [306].

#### Commensalisme, opportuniste

*C. albicans* est un commensal présent chez environ 70% de la population humaine [189]. Il colonise de manière asymptomatique les muqueuses vaginales [84, 194], buccales, et cutanées [103, 244]. L'appareil digestif constitue une autre niche importante pour cet organisme [161] qui fait partie du microbiote humain [113, 210, 213]. Les genres *Saccharomyces* et *Candida* représentent la plus importante proportion de levures composant le microbiote, respectivement retrouvées chez 89% et 57 % des sujets de l'étude [121].

*C. albicans* reste à l'état de commensal chez l'hôte en bonne santé. Dans ce contexte, cette levure est bien tolérée par le système immunitaire. En revanche, ce micro-organisme peut devenir pathogène de manière **opportuniste** : il profite d'un affaiblissement des mécanismes de défense de son hôte pour devenir infectieux et s'y multiplier à son détriment.

Il existe de nombreux mécanismes de régulation du mode de vie commensal-pathogène. Parmi ceux-ci, nous pouvons noter l'auto-régulation via la sécrétion endogène de molécules de *quorum-sensing* entretenant l'état de levure avirulente [157] (voir partie 1.2.5). L'hôte régule également son mode de vie, notamment par le système immunitaire (macrophages, cellules dendritiques des muqueuses) qui est capable de reconnaître des protéines spécifiques à la paroi cellulaire du pathogène et de l'éliminer en cas d'inflammation [88, 229].

La compétition inter-espèces de la flore microbienne module aussi la multiplication de *C. albicans*. Les *Lactobacilles* jouent en particulier ce rôle d'antagoniste et participent au maintien de l'homéostasie de la population dans l'appareil digestif [213, 315] et l'appareil génital [133]. L'administration d'un antibiotique à large spectre peut mener à un déséquilibre du microbiote et amoindrir la résistance face à la colonisation de *Candida* [49, 213, 253] (Figure 1.1). Parmi les autres

---

1. Le commensalisme est une forme de parasitisme sans conséquence néfaste. C'est l'association symbiotique entre deux espèces, dont l'une retire un bénéfice sans que l'autre ne soit ni bénéficiaire ni désavantagée.

facteurs participant à la pathogénèse, on compte aussi l'altération de la barrière épithéliale et des changements physico-chimiques de l'environnement, qui seront présentés plus loin (partie 1.2) [161].

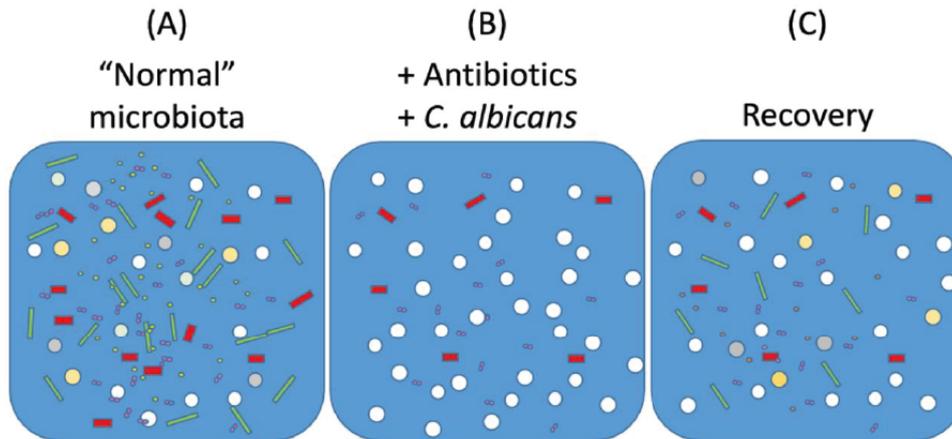


FIGURE 1.1 – Effet d'un traitement antibiotique sur la dynamique de croissance du microbiote (bâtonnets) et la (re)colonisation de l'appareil digestif par *C. albicans* (cercles blancs) pouvant altérer la diversité des espèces. Illustration issue de l'article Neville *et al.* [213].

### Pathogénicité et incidence épidémiologique

Plusieurs espèces de *Candida* sont pathogènes, les cinq plus communes sont : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*, qui constituent ensemble 90% des incidences. L'espèce *C. albicans* représente à elle seule plus de la moitié des cas d'infection [214, 226, 314]. Elle est responsable de deux types d'affections : les candidoses **superficielles** et les candidoses **systémiques** ou « **candidémies** ».

Les candidoses superficielles sont des infections locales assez communes qui restent généralement bénignes. Elles peuvent concerner des sujets sains et touchent principalement les muqueuses vulvo-vaginales, buccales et oropharyngées [304] mais peuvent aussi être cutanées. On estime que 75% des femmes seront affectées par une candidose vulvo-vaginale au cours de leur vie. Les candidoses oropharyngées affectent elles principalement les sujets ayant une déficience du système immunitaire comme les nouveau-nés ou les patients atteints du SIDA.

Les candidémies sont des infections profondes et disséminées qui peuvent être fatales à l'organisme. Elles surviennent majoritairement chez les sujets dont le système immunitaire est fortement affaibli ou qui ont subi des soins médicaux lourds et invasifs. Leur importance clinique est grandissante. Un programme mondial de surveillance antifongique mené de 1997 à 2003 a détecté *Candida* dans 95% des isolats d'échantillons sanguins de patients infectés par des levures, dont 66% de *C. albicans* [227].

### Facteurs de risques des candidémies

Les candidémies sont pour la plupart des infections d'origine nosocomiale et surviennent pour beaucoup lors de séjours prolongés en soins intensifs. D'après une étude menée dans 75 pays, les *Candida* sont responsables de 18% des infections en soins intensifs dans le monde [288]. Ces infec-

tions sont en majorité d'origine endogène (elles sont causées par les propres souches du patient) mais peuvent être exogènes via l'intrusion de matériel médical contaminé par exemple.

Les infections exogènes concernent particulièrement les services chirurgicaux et de réanimation, par exemple lors de l'insertion d'un cathéter intravasculaire central ou urinaire, d'une assistance respiratoire ou lors de transplantation d'organes [109]. La colonisation de l'appareil digestif représente quant à elle un réservoir endogène important d'infection via la chirurgie de l'abdomen [23, 164, 222].

Les facteurs de risques des candidémies sont nombreux, les principaux décrits dans la littérature sont l'administration d'antibiotiques à large spectre, d'immunodépresseurs ou de corticoïdes. Les patients âgés, diabétiques, ou atteints du VIH et de manière générale dont le système immunitaire est fortement affaibli, sont aussi à risque [23, 164, 222].

## Développement des candidémies

Lorsque la barrière épithéliale est endommagée, au cours d'un acte chirurgical par exemple, les souches endogènes peuvent la traverser et disséminer par la circulation sanguine. La présence éventuelle d'un cathéter intraveineux constitue alors un support à la formation de biofilms microbiens, contribuant à la multiplication du pathogène. Finalement si le patient n'est pas rapidement traité par un antifongique, *C. albicans* se propage dans l'organisme, menant à une candidémie généralisée (Figure 1.2).

Une fois dispersée par la circulation sanguine, *Candida* est capable d'infecter quasiment tous les organes : le système urinaire et rénal [211], le système respiratoire [187], le cerveau, les reins, le cœur [223], les poumons [44]. De rares cas d'infections des os (ostéomyélites) ont également été décrits [263].

Évaluer le taux de mortalité tributaire des candidémies est complexe car elles surviennent principalement chez des patients déjà affectés par d'autres pathologies. Le bilan reste cependant lourd : une étude regroupant les données d'hôpitaux Européens estime le taux de mortalité due à des candidémies à 30 jours à 37% en soins intensifs [151].

### 1.1.2 Polymorphisme chez *C. albicans*

Nous avons vu l'importance épidémiologique de *C. albicans* et les affections que cet organisme peut provoquer. Dans cette partie nous allons brièvement présenter un aspect central chez cet organisme : le polymorphisme.

*C. albicans* est un organisme **polymorphe**, c'est-à-dire capable de proliférer sous différentes formes. Les cellules prolifèrent de manière stable en conservant leur phénotype<sup>2</sup> ou en génèrent un autre en exprimant différents gènes durant la **morphogénèse**.

Les morphologies levures *blanches*, pseudo-hyphes et hyphes sont les plus documentés [272, 268, 106] et ce sont celles qui nous intéresseront particulièrement par la suite. Il existe d'autres types cellulaires comme les phénotypes « GUT » [220] et « *opaque* » (sous forme levure ou hyphe) (Figure 1.4-B), ou les chlamydo-spores [267] que nous ne détaillerons pas dans ce manuscrit.

Sous la forme levure *blanche*, *C. albicans* prolifère de manière asexuée par bourgeonnement et produit des cellules ellipsoïdales d'environ 5 µm de diamètre, similaires à la levure *S. cerevisiae*

---

2. Phénotype : expression visible des gènes; ensemble de caractères anatomiques, physiologiques et antigéniques permettant d'identifier et de classer chaque type de bactérie ou de virus. (Larousse)

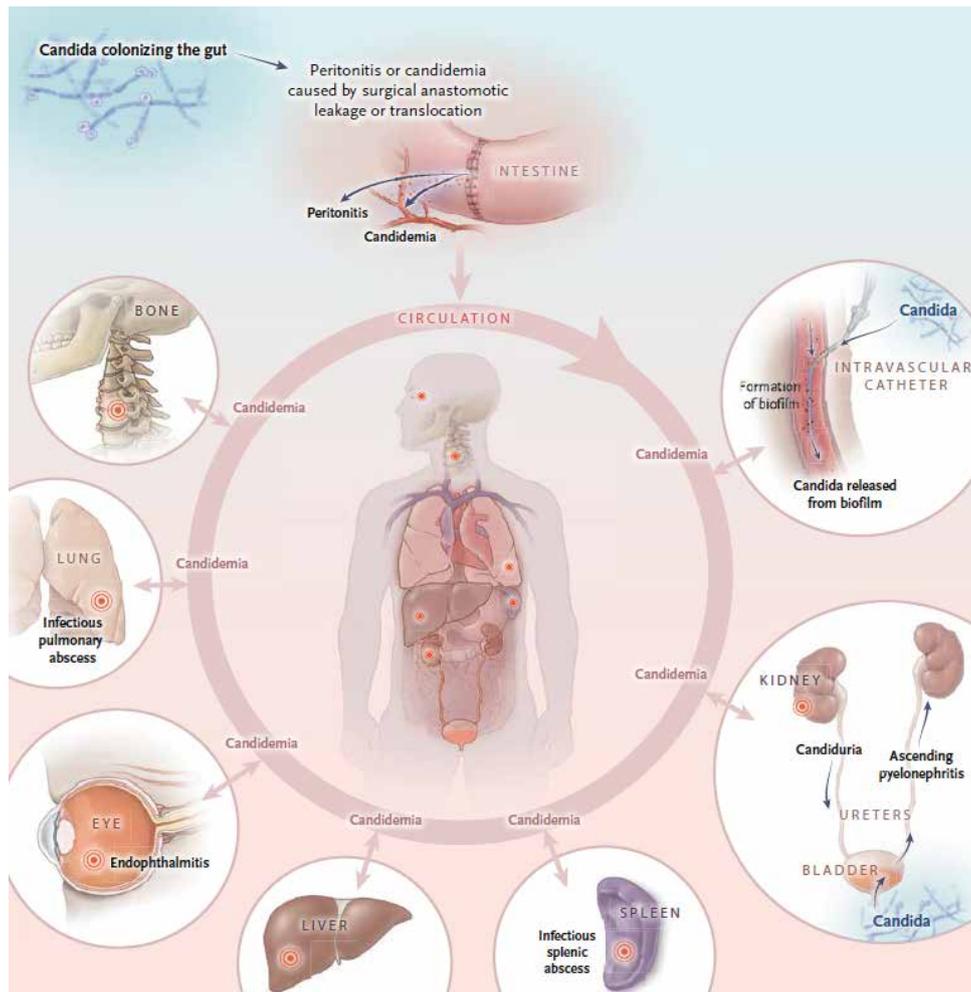


FIGURE 1.2 – Exemple de modes d’infections durant le développement d’une candidémie et les principaux organes touchés. Les souches colonisant initialement l’appareil digestif traversent la paroi intestinale compromise et disséminent dans le sang. Elles peuvent alors coloniser quasiment n’importe quel organe. La formation de biofilms sur les cathéters participe également à la propagation de l’infection. Illustration issue de l’article Kullberg *et al.* 2015 [160].

(Figure 1.4-A). La forme dite « *pseudo-hyphe* » se compose de cellules plus allongées dont la septation est incomplète, c’est-à-dire qu’elles ne se détachent pas les unes des autres une fois le cycle cellulaire achevé (Figure 1.4-C).

Enfin ce pathogène peut produire de longs filaments multicellulaires appelés « *hyphes* » qui forment un mycélium. Contrairement aux pseudo-hyphes, les hyphes ne présentent pas de constriction au niveau des jonctions entre cellules (septa). Ils forment une chaîne de cellules mono-nuclées appelées « articles » (Figure 1.4-D). Chaque article est très polarisé et mesure 2  $\mu\text{m}$  de diamètre pour environ 10 – 20  $\mu\text{m}$  de long.

Du fait de leur polarisation, les hyphes sont capables d’explorer leur environnement sur plusieurs centaines de micromètres en quelques cycles cellulaires seulement. A noter que les morphologies des hyphes et des pseudo-hyphes peuvent être très proches et être parfois toutes deux référencées comme « filaments » [272].

Le passage d’un morphotype à l’autre est régulé par un ensemble complexe de voies de signalisation qui intègrent de nombreux changements physico-chimiques de l’environnement [33, 60]

(Figure 1.3). Soulignons que ces transitions de phénotypes sont réversibles : par exemple les articles peuvent produire des branchements en filaments mais aussi des levures latérales (Figure 1.4-E). D'autres pathogènes fongiques humains sont également dimorphiques, comme *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* ou *P. marneffei*. En revanche, s'ils croissent sous forme de mycélium (hyphes) en dehors du corps humain, on les retrouve uniquement sous la forme de levures dans les tissus hôtes [147]. Parmi eux, *C. albicans* est devenu un modèle central notamment parce qu'il présente l'avantage d'avoir 80% de son génome en commun avec la levure *S. cerevisiae* ce qui facilite son étude [139].

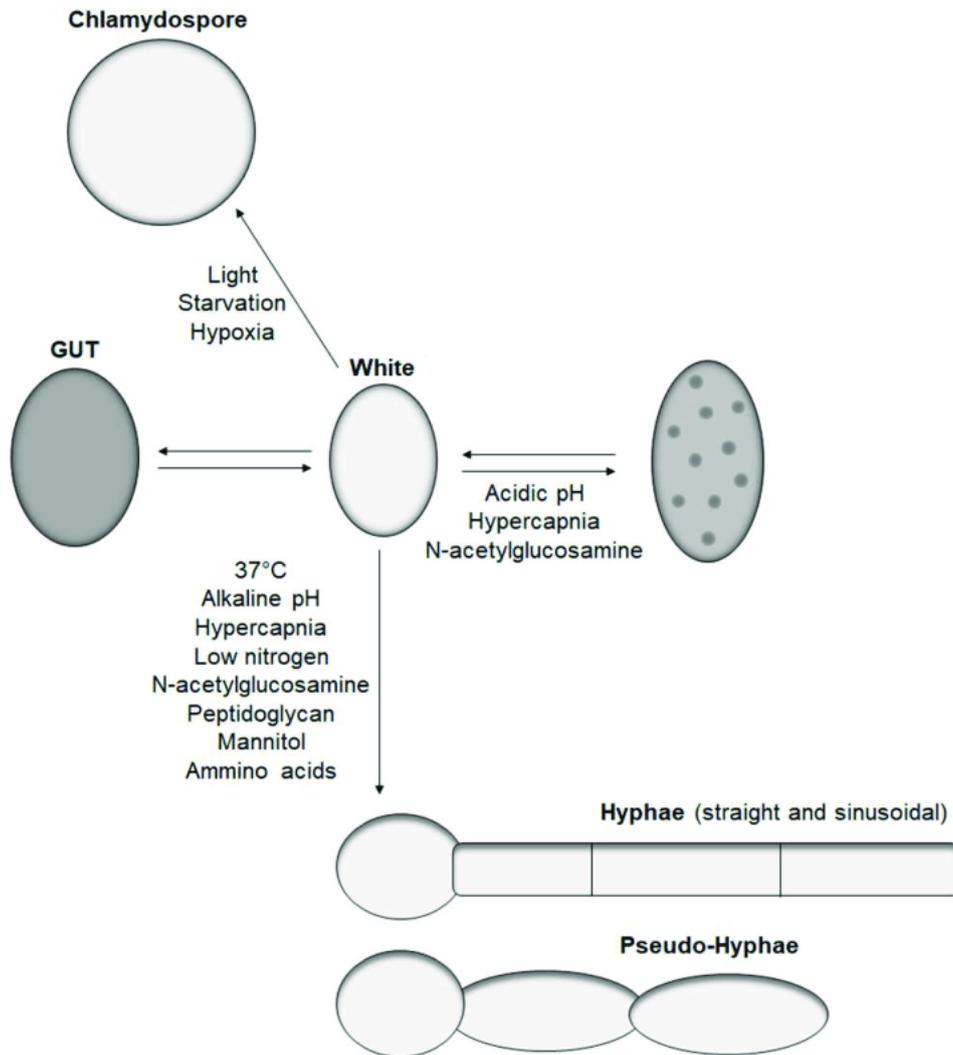


FIGURE 1.3 – Résumé des transitions morphologiques les plus étudiées chez *C. albicans* et une partie des nombreux facteurs environnementaux impliqués. Illustration adaptée de l'article de Cottier *et al.* [60].

### 1.1.3 Polymorphisme et pathogénicité

Nous allons maintenant discuter l'importance du polymorphisme dans les modes de vie de *C. albicans*. Si *C. albicans* adapte son phénotype aux nombreux environnements de l'hôte en tant que commensal, la morphogénèse participe aussi à la propagation et à la virulence durant l'infection,

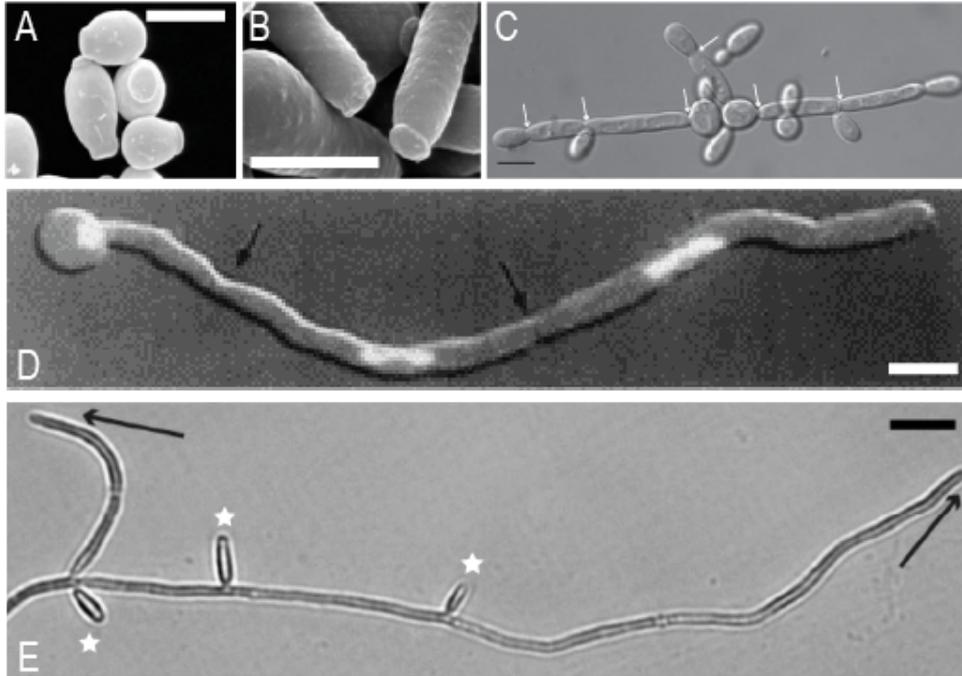


FIGURE 1.4 – Aspects des morphologies les plus communes chez *C. albicans*. (A) Les phénotypes levures *blanc* et (B) *opaque* vus sous microscopie électronique à balayage [202] Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$ . (C) Les pseudo-hyphes sont polarisées mais des constriction restent visibles entre cellules (flèches blanches). Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$  [272]. (D) Les hyphes sont composés de plusieurs articles délimités par les septa (flèches noires) et contiennent chacun un noyau (ici en blanc). Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$  [19]. (E) Les cellules composant un hyphe peuvent produire des branchements polarisés (flèches noires) et des levures latérales (étoiles). Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$  [260].

particulièrement la transition réversible levure-hyphe [216, 247]. Enfin ces différentes morphologies entrent dans la composition de **biofilms** : des assemblées structurées de cellules, denses et résistantes aux antibiotiques notamment.

### Adaptation à l'environnement colonisé

La plasticité de *C. albicans* lui permet d'adapter son métabolisme à la colonisation d'environnements variés, en produisant des phénotypes spécifiques aux niches de l'hôte.

Dans leur étude, Xie *et al.* [310] ont par exemple montré que le phénotype *opaque* prolifère mieux sur la peau que le phénotype *blanc*. Ils proposent que des changements métaboliques entre ces deux phénotypes expliquent cette adaptation. En effet le phénotype *blanc* repose principalement sur les voies de fermentation (transport de glucose) tandis que les levures *opaques* surexpriment des voies reliées à la respiration oxydative ce qui pourrait constituer un avantage sur la peau.

Un autre modèle de colonisation commensale a mis en lumière une transition gastro-intestinale *in vivo* dénommée dans l'étude « GUT » (*Gastrointestinally-induced Transition*). Le métabolisme de ce phénotype est particulièrement adapté à l'utilisation des chaînes d'acides-gras présents en plus grande quantité en fin d'appareil digestif [220].

Finalement, la colonisation commensale reste encore largement associée au morphotype de levure dans la littérature, notamment dans des modèles murins de colonisation de l'appareil di-

gestif dans lesquels elle prédomine largement (90%) sur la forme filamenteuse [301]. Il est cependant difficile de trancher sur l'abondance et l'importance des hyphes dans ce type d'expériences *in vivo*, la détection étant le plus souvent indirecte ou *a posteriori*.

### Importance de la plasticité de *C. albicans* dans la progression de l'infection

Les levures et les hyphes jouent tous deux un rôle dans la propagation des infections : alors que les levures disséminent et colonisent, les hyphes sont responsables de l'invasion et des dommages causés aux tissus. De nombreux cas cliniques d'invasions d'organes [77] et des modèles expérimentaux d'infections localisées [108] montrent la présence majoritaire de filaments entraînant une réponse inflammatoire au niveau des sites d'infection (Figure 1.5-A,B) [117, 207]. Ces mécanismes d'invasion seront présentés plus en détails dans le paragraphe 1.1.4.

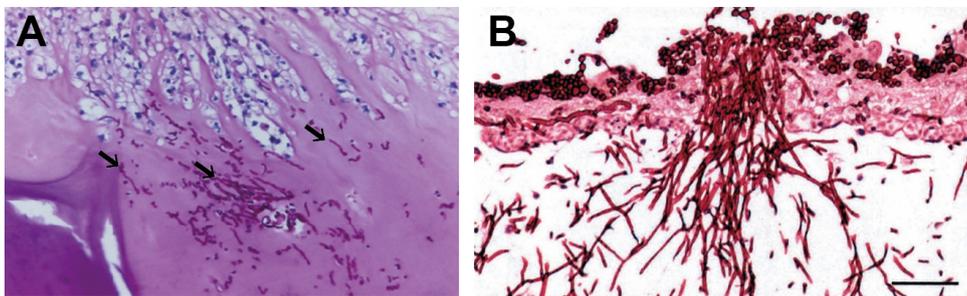


FIGURE 1.5 – (A) Coupe histologique d'un abcès causé par *C. albicans* au niveau d'une côte. Notons la présence de filaments envahissant les tissus (flèches). Illustration adaptée de l'article Delfanti *et al.* [77]. (B) Des hyphes envahissant un épithélium (membrane extra-embryonnaire d'un œuf) [108]. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. [39].

Pour étudier l'apport spécifique des hyphes dans la virulence des candidémies, de nombreuses études ont aussi utilisé des modèles *in vivo* d'infections disséminées et des mutants des voies biologiques régulant la morphogénèse chez *C. albicans*.

Dans l'étude de Saville *et al.* [247], les auteurs ont développé une souche dont la transition levure-hyphe est conditionnée par la présence d'un antibiotique qu'ils ont injectée dans le sang de souris. En l'absence d'antibiotique, les cellules rendues incapables de filamenter conservent leur capacité d'infiltration des organes, en revanche les animaux survivent à l'infection. Lorsque l'antibiotique est administré plusieurs jours suivant l'inoculation, rétablissant la filamentation, le taux de survie des animaux chute à nouveau (Figure 1.6-e). Ces travaux indiquent que les hyphes sont nécessaires à la virulence, mais sont-elles suffisantes au développement d'une candidémie?

Les rôles distincts des levures et des hyphes sont particulièrement visibles dans les travaux de Seman *et al.* [254]. Cette équipe utilise des larves de poisson-zèbre comme modèle d'infection disséminée. Bien qu'elles constituent un écosystème plus éloigné des humains par rapport à la souris, ces larves ont l'avantage d'être transparentes à la lumière blanche. En inoculant des souches de *C. albicans* génétiquement modifiées pour être rendues fluorescentes, cette équipe a pu observer *in vivo* et *in situ* que seules les souches rendues non-filamenteuses disséminent dans l'organisme (Figure 1.6-c,d). En comparaison, la souche sauvage reste localisée sur le site d'infection après avoir rapidement filamenter (Figure 1.6-a,b). En parallèle le taux de survie à 24 h post-infection est réduit à 25% avec la souche sauvage alors que les animaux infectés par des mutants incapables de filamenter survivent.

D'autre part, les articles de Braun *et al.* [39] et Murad *et al.* [208] montrent que les mutants à "filamentation obligatoire" sont avirulents chez la souris (Figure 1.6-f). De plus des mélanges d'inoculas de souches bloquées sous forme levure ou hyphale ne présentent pas de synergie, et n'atteignent pas les niveaux de mortalité des souches sauvages [39]. Ces résultats soulignent l'importance très probable des **transitions morphologiques réversibles** dans le développement et la virulence d'infections généralisées.

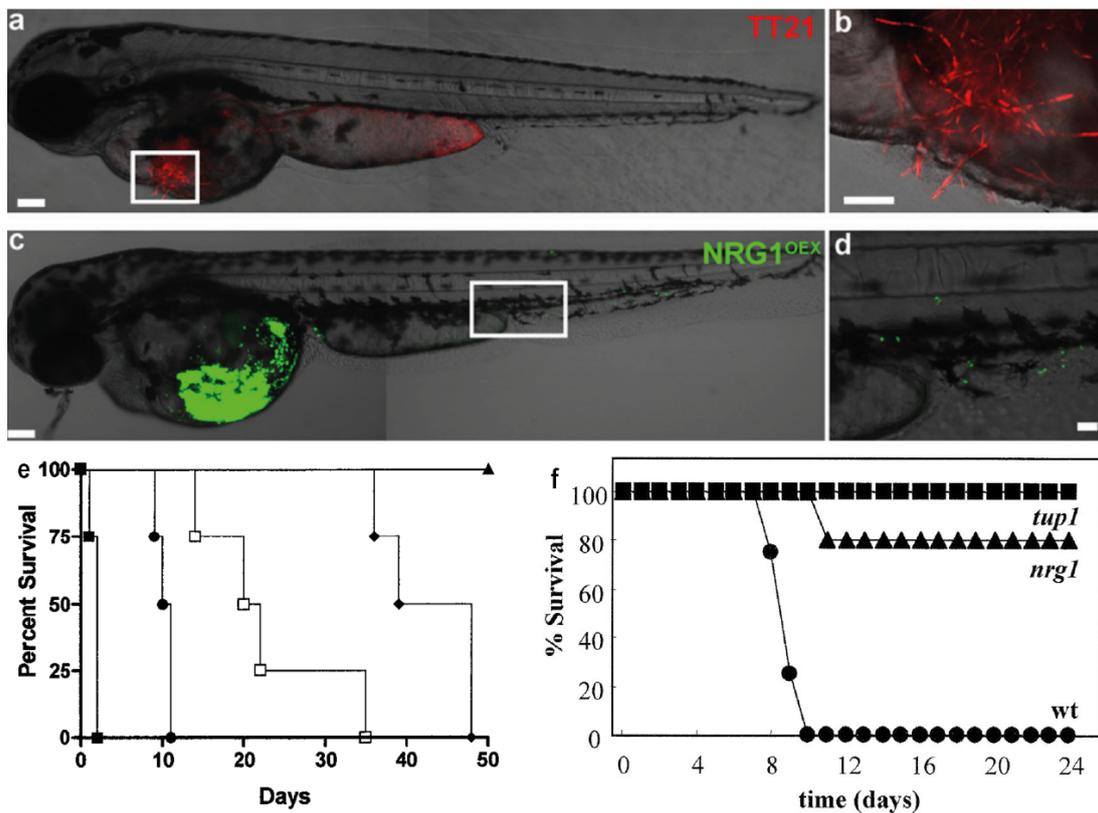


FIGURE 1.6 – Les rôles respectifs de dissémination et de virulence des phénotypes levure et hyphes dans des modèles *in vivo* de candidémies. Larve de poisson-zèbre 24h après l'inoculation d'une souche sauvage dont les hyphes ont traversé les tissus (a,b) et d'une souche non-filamenteuse qui a disséminé dans l'appareil digestif [254]. (e) Modèle murin d'infection disséminée. Les animaux survivent au phénotype levure (▲) mais meurent lorsque la filamentation est de nouveau permise (■, ●, □, ◆) [247]. (f) Dans un autre modèle murin d'infection disséminée : les mutants bloqués dans l'état d'hyphes sont avirulents (■, ▲) [208].

### 1.1.4 Mécanismes d'invasion et de virulence

Nous avons vu l'importance du polymorphisme durant la colonisation et la propagation de l'infection. Dans ce paragraphe nous allons d'abord décrire brièvement les étapes de formation des biofilms et leur caractère pathogène. Nous présenterons ensuite les principaux mécanismes de virulence spécifiques aux hyphes et comment ils endommagent les tissus envahis.

## Les biofilms

La plupart des micro-organismes qui composent le microbiote prolifèrent en étant attachés les uns aux autres sur une surface et forment un biofilm. À maturité, les cellules qui composent ces structures sont encapsulées dans une matrice extra-cellulaire qui joue un rôle protecteur. *C. albicans* est capable de former de telles structures sur des surfaces abiotiques comme des cathéters [153], des appareils dentaires, ou les muqueuses buccales et intestinales [238]. Ces biofilms sont essentiellement étudiés pour leur caractère pathogène car ils participent notamment à la propagation de l'infection [93, 14, 252]. Par exemple, lorsque *Candida* circule dans le sang, peuvent adhérer et former un biofilm sur le cathéter inséré. Le biofilm ainsi formé se comporte alors comme un relais, amplifiant la propagation de l'infection.

L'établissement de biofilms peut être découpé en quatre étapes (voir Figure 1.7-A) [92]. Tout d'abord des cellules adhèrent au substrat et forment une couche basale [190]. Ces cellules produisent alors des hyphes qui vont structurer la partie apicale du biofilm (voir Figure 1.7-C). L'ensemble des gènes exprimés favorise ensuite la production d'une matrice extra-cellulaire principalement composée de polysaccharides [115]. Ces phases se déroulent typiquement sur une période de 24 à 48h. Finalement la transition réversible *hyphe-levure* engendre la production et la dispersion de levures issues du biofilm mature [279].

La morphogénèse est également importante dans l'établissement des biofilms où l'on retrouve les morphologies levure, pseudo-hyphe et hyphe (voir Figure 1.7-B) [252]. Une étude de Baillie *et al.* a montré que deux mutants ne produisant respectivement que des levures ou que des hyphes sont tous deux incapables de former une architecture de biofilm stable et fermement attachée au substrat [16].

Plusieurs études considèrent que les biofilms sont pathogènes et participent à la virulence [10, 153]. Notamment, ils semblent atténuer la susceptibilité aux espèces oxydantes et aux antifongiques des cellules qui les composent par rapport aux cellules planctoniques [15]. Différents mécanismes pourraient expliquer cette résistance accrue : la diffusion limitée de molécules au travers de la matrice extra-cellulaire, l'activation contact-dépendante de transporteurs moléculaires [236], ou encore le ralentissement de la croissance d'une sous-population de cellules [14]. Les biofilms résistent aussi mieux au système immunitaire de l'hôte, notamment aux neutrophiles [312, 142] et aux macrophages recrutés qui y migrent peu facilement [5].

## Les facteurs de virulence des hyphes

### Adhérence à l'épithélium

Nous venons de voir que l'adhérence au substrat constitue la première étape de formation d'un biofilm. C'est aussi un mécanisme impliqué lorsque des hyphes envahissent un tissu épithélial. Ce processus se déroule en deux phases : d'abord les interactions non-spécifiques entre des protéines à la paroi des levures (famille des agglutinines) et les muqueuses permettent l'attachement. Ensuite durant la transition levure vers hyphe la composition de la paroi cellulaire change et de nouvelles protéines de la paroi de la famille des **adhésines** sont recrutées [141]. Ces protéines interagissent avec de nombreux ligands spécifiques aux cellules de l'hôte comme les cadhérines et les intégrines ou des composants de la matrice extra-cellulaire (dont fibronectine et collagène) [141, 129, 228]. Les hyphes expriment plusieurs glycoprotéines impliquées dans l'adhérence aux épithelia qui sont particulièrement étudiées. La protéine Hwp1 (*Hyphal Wall Protein 1*) est la plus étudiée et joue un rôle dans le processus d'infection. Elle permet aux hyphes de s'attacher par des liaisons covalentes aux cellules hôtes [205]. On compte aussi huit protéines de la

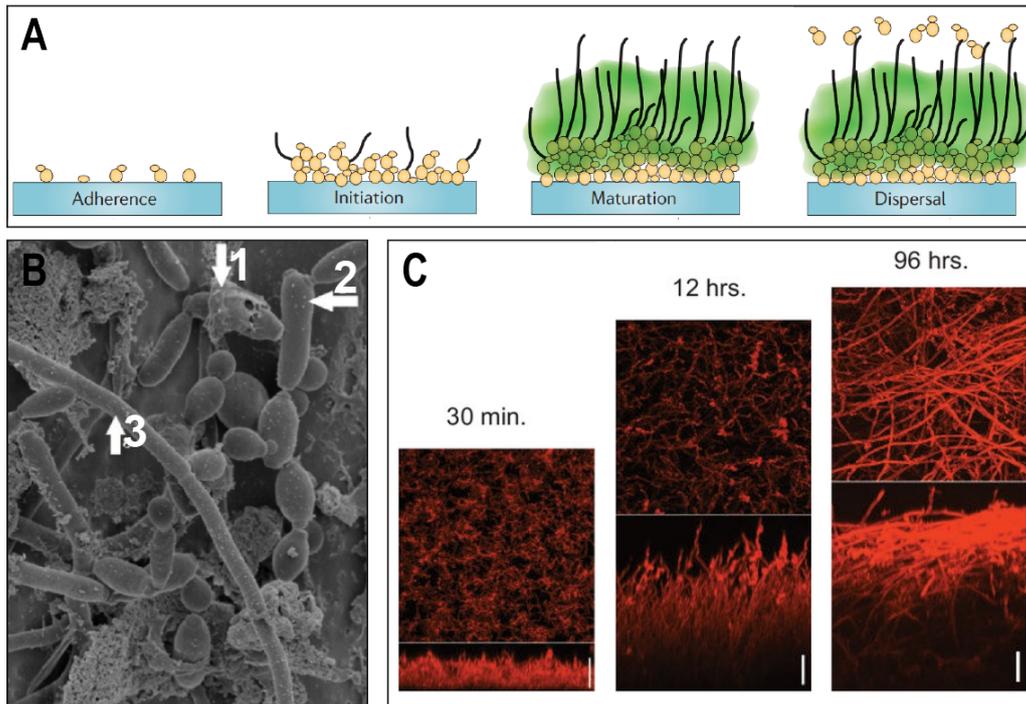


FIGURE 1.7 – (A) Schéma présentant les étapes de formation et de développement d'un biofilm [92]. (B) Biofilm formé *in vivo* sur le cathéter veineux central d'un patient. 1 : Matrice extracellulaire 2 : Pseudo-hyphe 3 : Hyphe. Grandissement  $\times 4500$  [252] (C) Formation de la structure tridimensionnelle d'un biofilm vue en coupe (images en bas) et du dessus (images en haut) en microscopie confocale. La couche basale est composée de levures et la partie apicale d'hyphes. Barres d'échelles  $50 \mu\text{m}$  [184].

famille des ALS (*Agglutinin-Like Sequence*) qui s'attachent aux parois cellulaires via des liaisons  $\beta$ -glucanes [129, 317].

### Pénétration passive et active des tissus

Une fois les hyphes fermement attachés à l'épithélium, ils pénètrent la face apicale en perçant directement les cellules hôtes ou leur jonctions (Figure 1.9). Cette invasion profonde des tissus repose sur deux stratégies : la pénétration passive par endocytose et la pénétration active (ces étapes sont résumées Figure 1.8).

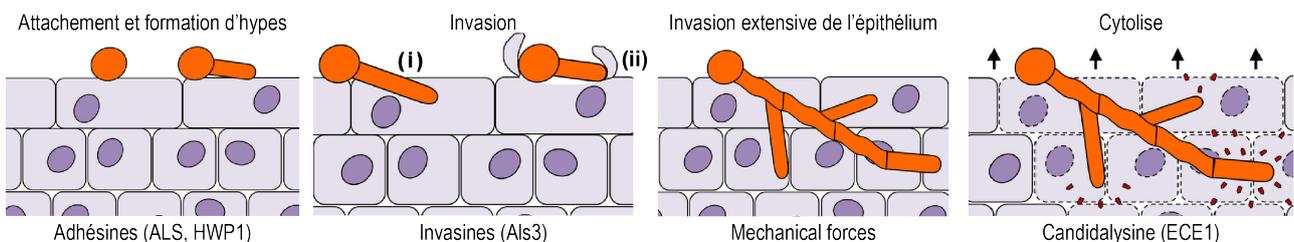


FIGURE 1.8 – Schéma présentant les étapes et les différents modes d'invasion d'un épithélium chez *C. albicans*. (i) Pénétration active du pathogène (ii) Endocytose du pathogène par l'hôte. Illustration adaptée de Wilson *et al.* [305].

La pénétration passive par endocytose est dirigée par l'hôte. Elle repose sur la présence de protéines de la paroi cellulaire des hyphes qui interagissent avec les *E-cadhérines* présentes en surface des cellules épithéliales. C'est cette interaction qui provoque l'endocytose du microbe par les cellules hôtes qui l'internalisent. L'adhésine Als3 joue un rôle majeur dans ce mécanisme : des hyphes morts sont toujours endocytés si Als3 se trouve en surface de leur paroi [228].

Les hyphes peuvent aussi pénétrer activement la barrière épithéliale en sécrétant des enzymes et en développant des forces mécaniques. Durant la pénétration active, les forces physiques engendrées par l'élongation à l'extrémité de l'hyphe sont de l'ordre de la dizaine de micronewtons [274, 79]. Ces forces équivalent à une pression de  $\sim 1$  MPa et suffisent à la pénétration mécanique des cellules épithéliales dont le module élastique ne dépasse pas la centaine de kilopascals [4, 188, 1].

Les hyphes sont aussi capables de dégrader les cellules en sécrétant plusieurs enzymes hydrolytiques, notamment de la famille des Saps [249]. Ces enzymes perméabilisent les membranes et dégradent les jonctions inter-cellulaires de l'épithélium pour en faciliter la pénétration mécanique par élongation [287].

Dans un second temps, le pathogène peut lyser des cellules par la sécrétion d'une toxine cytolytique, la *candidalysine*, un peptide encodé par le gène *ECE1* (*Extent of Cell Elongation 1*). La délétion du gène *ECE1* ne bloque pas la filamentation mais entraîne une importante atténuation des dommages faits aux cellules. Moyes *et al.* suggèrent aussi que c'est durant cette phase que la réponse immunitaire épithéliale se déclenche (recrutement de neutrophiles, sécrétion de cytokines) [206]. Ensemble ces altérations de la barrière épithéliale facilitent la translocation plus profonde des hyphes dans les tissus [67].

Le mode d'invasion dépend en partie de l'interaction avec le tissu de l'hôte. Par exemple, *C. albicans* n'est capable d'envahir l'endothélium intestinal que par pénétration active, tandis que les deux modes d'action sont impliqués pour pénétrer l'épithélium oral [67].

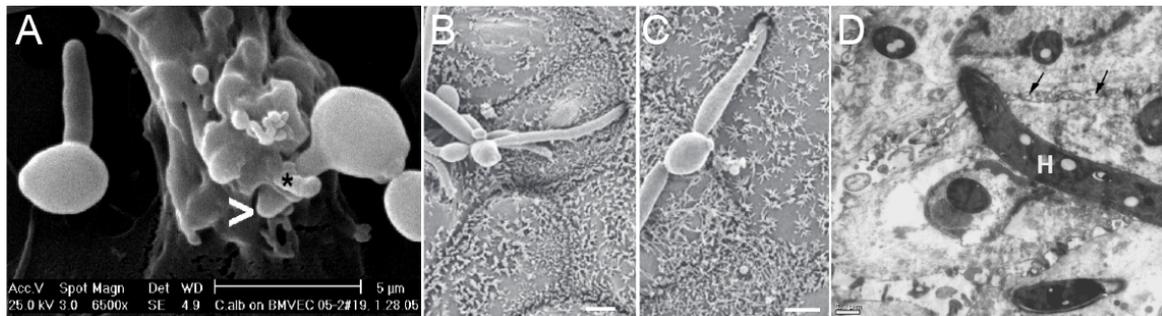


FIGURE 1.9 – La pénétration d'hyphes dans des tissus endothéliaux vue en microscopie électronique à balayage. (A) Une cellule initie l'endocytose d'un hyphe (>) en l'enveloppant avec sa membrane (\*) [175]. Pénétration active (B) au niveau d'une jonction inter-cellulaire, (C) à la surface d'une cellule [67]. Barres d'échelle 5  $\mu\text{m}$ . (D) Croissance d'un hyphe (H) au travers de plusieurs couches cellulaires. Les flèches indiquent une membrane cellulaire [175]. Barre d'échelle 1  $\mu\text{m}$ .

### *Stratégies de survie à la phagocytose*

Le premier mécanisme de défense passe par le recrutement de neutrophiles et de macrophages sur le site d'infection. Ces cellules immunitaires traquent et internalisent les micro-organismes intrus pour les détruire durant la phagocytose [88]. *C. albicans* est capable de moduler la réponse du système immunitaire pour éviter la capture et survivre via plusieurs stratégies.

Plusieurs études ont montré que le changement de composition de la paroi durant la morphogénèse affecte la réponse des phagocytes [137]. Cette stratégie repose particulièrement sur le masquage de motifs spécifiques de la paroi cellulaire, les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), qui sont reconnus par le système immunitaire.

Lewis *et al.* ont également montré que les macrophages sont capables de reconnaître et de traquer *C. albicans* indépendamment de son morphotype. Ce processus dépendrait plutôt de l'état de glycolisation de la paroi cellulaire de *Candida*. En revanche, l'internalisation des hyphes est significativement ralentie lorsqu'elles mesurent plus de 20  $\mu\text{m}$  [167]. L'engouffrement durant environ 2h, et les hyphes s'allongeant en moyenne de  $\sim 20 \mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  [106], Erwig *et al.* proposent que ces filaments soient devenus trop longs pour être phagocytés [88].

La phagocytose se poursuit par la fusion du phagosome, vésicule contenant le pathogène, avec les lysosomes pour former une vacuole acide : le phagolysosome. L'élément phagocyté est alors lysé dans cet environnement riche en espèces réactives oxydantes et en enzymes hydrolytiques. *C. albicans* peut interférer dans la maturation du phagolysosome en l'alcalinisant [294], en sécrétant des espèces antioxydantes [42, 224] ou en induisant sa propre expulsion avant la lyse [66].

La morphogénèse serait aussi impliquée dans la survie à la phagocytose. Par exemple, la formation d'un hyphe dans le phagosome peut induire le mécanisme de mort cellulaire par pyroptose, mais l'élongation du filament permet également son évation par la rupture physique de la membrane cellulaire (Figure 1.10). Des stratégies similaires à l'invasion épithéliales (forces mécaniques, sécrétion d'enzymes) entrent là aussi en jeu [155, 88].

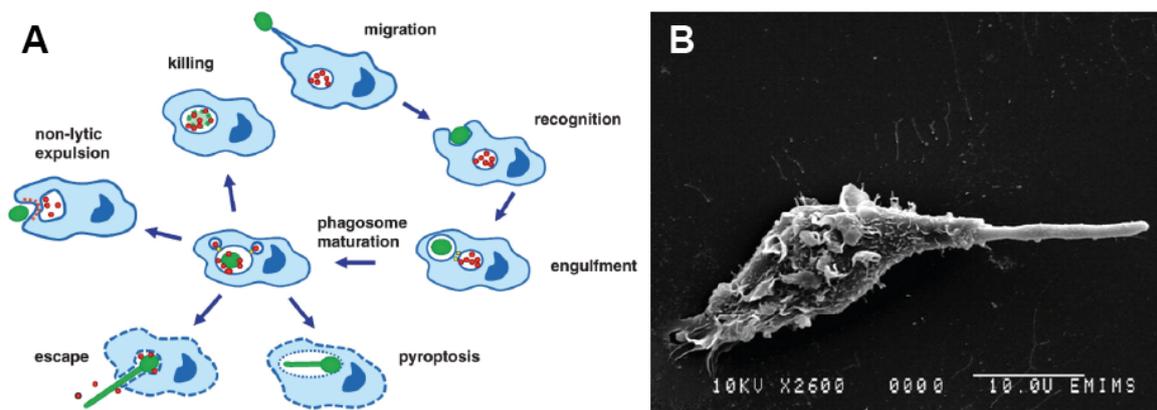


FIGURE 1.10 – (A) Les stratégies de survie et d'évasion de *C. albicans* face à la phagocytose. Adapté de Dantas *et al.* [66]. (B) Un hyphe ayant rompu la membrane d'un macrophage vu au microscope électronique à balayage [193].

## 1.2 Facteurs physico-chimiques modulant la morphogénèse

Nous venons de voir que *C. albicans* est un pathogène de première importance possédant des facteurs de virulence multiples. Parmi ces facteurs, on compte l'adaptation à des environnements physico-chimiques et à des sources de nutriments très variés. D'autre part, la plasticité morphologique et plus particulièrement le mode de croissance hyphale, constituent un trait de virulence crucial à la pathogénicité.

Dans cette partie, nous allons présenter quelques-uns des nombreux changements physico-chimiques qui modulent la morphogénèse et plus spécifiquement la transition levure vers hyphe.

De nombreuses études ont exploré les effets de différents stress *in vitro* pour disséquer les voies de signalisations impliquées et leur lien avec la morphogénèse.

Nous commencerons par décrire les principales voies de signalisation impliquées dans la morphogénèse et les mécanismes moléculaires qui permettent de réguler l'initiation et l'extension hyphale. Ensuite, nous nous focaliserons sur trois paramètres physico-chimiques impliqués dans la morphogénèse : la température, le pH, et les facteurs de croissance.

## 1.2.1 Circuit de signalisation contrôlant la morphogénèse

### Présentation générale des stimuli induisant la morphogénèse

La transition morphogénétique levure vers hyphe est modulée par une multitude de paramètres de l'environnement. Le réseau signalétique de ce programme est complexe. Il reflète la variété des paramètres physico-chimiques des niches occupées par *C. albicans* dans l'hôte. Parmi eux, on compte la privation de nutriments, la présence de facteurs chimiques (sérum, N-acétylglucosamine), un pH alcalin, une élévation de la température, un niveau élevé de CO<sub>2</sub> [25, 56, 54].

Les effets et interdépendances de ces stimuli physiologiquement pertinents ont été décortiqués *in vitro*. Ces résultats sont toujours à nuancer car ils ne reflètent qu'une facette des aspects rencontrés *in vivo*. Ainsi, des mutants de certaines voies de signalisation sont incapables de répondre à plusieurs stimuli et de filamenter *in vitro*, mais forment des hyphes dans l'environnement complexe de modèles *in vivo*.

Par exemple, un pH de 7,4 combiné à une température de 37°C, à une concentration de CO<sub>2</sub> de 5%, à un faible taux de glucose et à la présence de sérum, récapitulent chacun une partie des conditions physico-chimiques du système sanguin des mammifères, et favorisent tous la filantation [258, 45, 148].

Les deux voies de signalisation majeures qui modulent le programme de transition levure-hyphe sont la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et la voie Ras-cAMP-PKA,<sup>3 4</sup>. Ces deux voies répondent à des dizaines de paramètres physico-chimiques différents, allant du stress osmotique à la présence de CO<sub>2</sub> ou de sérum. Parmi les voies secondaires, on compte aussi la voie calcium-calcineurine, la voie de réponse aux acides aminés, la voie de senseur de nutriments TOR (*Target Of Rapamycin*) et la voie Rim de réponse au pH.

### Principaux mécanismes transcriptionnels et épigénétiques régulant la morphogénèse

#### Expression de gènes spécifiques aux hyphes

L'initiation et la croissance hyphale sont orchestrées par la co-expression d'un ensemble de gènes. Ils déterminent notamment le mode de croissance, le métabolisme, les propriétés morphologiques ou encore les nombreux facteurs de virulence. Le changement morphologique seul ne nécessite pas l'expression de tous ces gènes et ils sont généralement décrits comme *gènes associés aux hyphes* (en anglais, **HAGs**). Certains d'entre eux ont déjà été évoqués, comme les gènes codant pour la synthèse de protéines de la paroi cellulaire telles que les adhésines (Als, Hwph1), des enzymes hydrolytiques (Sap) ou encore Ece1. Une cycline spécifique aux hyphes (HGC1, *Hyphal G1 Cyclin 1*) est également exprimée. Cette protéine cytoplasmique est nécessaire à la croissance

3. Les molécules cAMP (*Cyclic Adenosine Mono-Phosphate*) sont des médiateurs intracellulaires qui diffusent dans le cytoplasme et transmettent des signaux chimiques (hormones), produits à partir de l'ATP.

4. PKA : protéine kinase A, une protéine transductrice des voies de signalisation.

hyphale dans toutes les conditions qui ont été observées et sa délétion permet uniquement la croissance de pseudo-hyphes [318, 24].

L'expression de ces HAGs est notamment modulée par l'interaction de marques épigénétiques avec des facteurs de transcription. Plus d'une cinquantaine de ces facteurs ont été décrits et sont présentés par Villa *et al.* dans leur revue de 2020. Les plus étudiés parmi eux sont Bcr1, Tec1, Efg1, Rim101, Sfl1, Nrg1 et Tup1 [303, 286].

### Plusieurs facteurs de transcription répriment la morphogénèse

Initialement, la morphogénèse est réprimée par plusieurs facteurs de transcription qui empêchent l'accès aux promoteurs des HAGs, et donc leur transcription. Parmi eux, Sfl1, Nrg1, Rfg1 et Tup1 sont des protéines clefs. Par exemple, une étude de Kadosh *et al.* a montré que la moitié des HAGs exprimés durant l'induction hyphale (sérum, 37°C) est placée sous le contrôle de ces trois derniers répresseurs [140]. Lorsque des paramètres environnementaux activent les voies de signalisation, la répression est levée temporairement permettant l'initiation du programme de filamentation. Ce programme global d'expression est ensuite entretenu via une réorganisation de la chromatine et la liaison de protéines à l'ADN, réprimant et exprimant un nouvel ensemble de gènes [34].

Tup1 ne se lie pas directement à l'ADN mais forme un complexe avec le corépresseur Ssn6, et interagit avec d'autres protéines de liaison à l'ADN (Nrg1, Mig1, Rfg1) pour cibler les séquences des promoteurs HAGs [130]. Tup1 est un répresseur global de la transcription des HAGs et il est nécessaire pour stabiliser les cellules dans le phénotype levure. Braun *et al.* ont montré que la délétion du gène *TUP1* entraîne la filamentation sous forme pseudo-hyphale dans toutes les conditions testées, et en l'absence de stimulus inductif [40].

La protéine Nrg1 se lie directement à l'ADN et recrute Tup1 pour réprimer la transcription des HAGs, particulièrement *ECE1* et *HWP1* dont les promoteurs contiennent des séquences spécifiques à la liaison de Nrg1 [208, 41, 100]. La délétion de *NRG1* entraîne l'hyper-filamentation dans toutes les conditions examinées [123] tandis que sa surexpression réprime la transition *in vitro* [58] et atténue la virulence *in vivo* [247, 246].

Rfg1 (*Repressor of Filamentous Growth*) opère selon un mécanisme similaire à Nrg1 et recrute le complexe Tup1-Ssn6 pour réprimer la filamentation. En revanche, contrairement à *NRG1*, la surexpression de ce gène ne bloque pas la filamentation [57]. Rfg1 régule notamment l'expression des gènes *ALS3*, *HWP1* et *ECE1*, conjointement avec Nrg1.

### Contrôle dynamique et épigénétique de la transition : initiation et maintenance

Comme nous venons de l'évoquer, plusieurs facteurs de transcription répriment ou activent le programme de croissance hyphale selon les stimuli perçus. Le programme de morphogénèse peut être décomposé en deux phases : la phase d'initiation et la phase d'extension (ou maintenance). Ces deux phases partagent l'expression de nombreux HAGs, mais certains gènes sont exprimés plus tardivement durant l'extension comme *ECE1* [235]. Des études récentes ont montré le rôle central des modifications de la chromatine dans l'orchestration de ces phases. Les interactions dynamiques entre les facteurs de transcription et l'état de la chromatine permettent d'intégrer divers signaux, puis coordonnent et modulent les réponses transcriptionnelles [262, 176, 180, 134].

### L'initiation et la "fenêtre d'opportunité"

Dans l'état "levure" initial, les sites de liaisons spécifiques à Nrg1 des régions promotrices des HAGs sont exposées, tandis que les sites de liaisons spécifiques à Brg1 sont masqués par les nucléosomes (voir Figure 1.11-B) [176].

L'initiation requiert à la fois l'inhibition de l'expression du gène *NRG1*, et la dégradation des protéines Nrg1 occupant les sites des promoteurs des HAGs. Il a été montré que la quantité de protéines Nrg1 diminue drastiquement dans les 30 min qui suivent l'induction à 37°C, et que ce phénomène coïncide avec l'émergence des hyphes [180]. Nrg1 n'est alors plus liée à l'ADN, mais cette phase est temporaire. Lu *et al.* ont montré que si aucun stimulus favorable à l'extension n'est intégré dans l'heure qui suit, le niveau d'occupation des sites HAGs (dont *BRG1*) par Nrg1 revient au niveau basal de l'état levure (voir Figure 1.11-A) [176]. On compte parmi ces stimuli la présence de sérum, de N-acétylglucosamine ou la privation de nutriments (glucose, azote).

Cette étude suggère donc que c'est durant cette "fenêtre temporelle d'opportunité" que la chromatine passe de l'état "levure" à celui d'"hyphes" et que le programme hyphal va pouvoir s'établir durablement. Plus précisément, le désassemblage des nucléosomes pendant l'initiation expose à la fois les sites de liaisons de l'activateur *Brg1*, et du répresseur *Nrg1* [181] (voir Figure 1.11-B). La levée d'inhibition de Nrg1 permet aussi l'expression temporaire d'autres HAGs dont *HPW1*, *ALS3* et *UME6*.

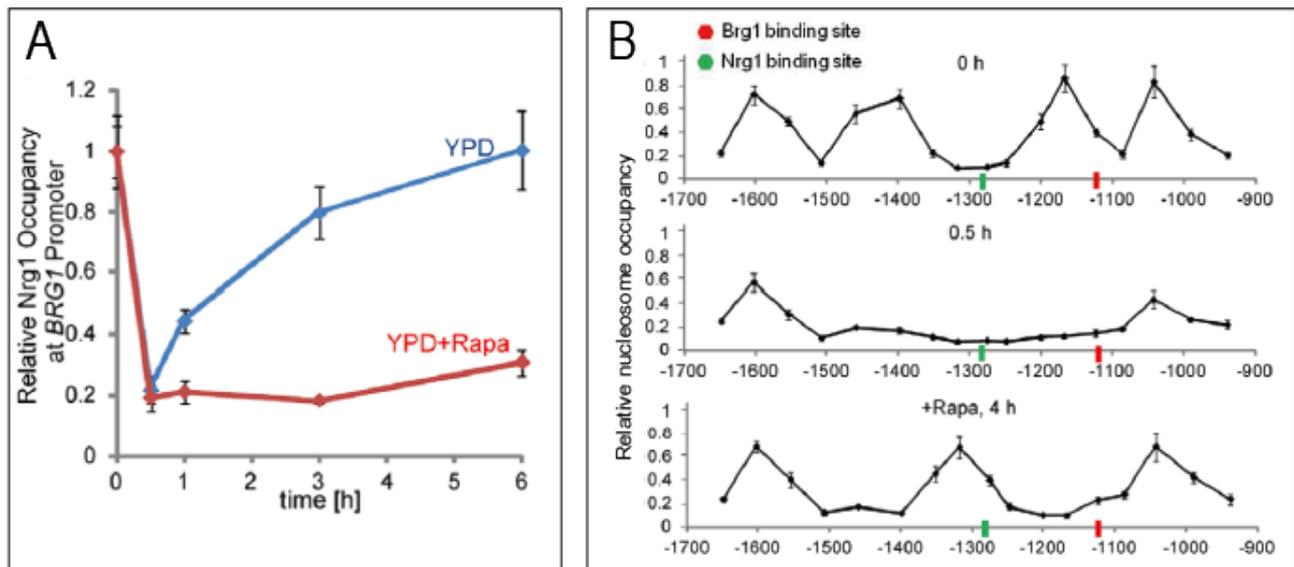


FIGURE 1.11 – (A) La protéine Nrg1 est dégradée et libère temporairement les sites d'activation de gènes associées aux hyphes durant la phase d'initiation hyphale. Si aucun signal favorable à l'extension n'est détecté (ici par ajout de rapamycine), le niveau d'occupation de l'ADN par Nrg1 revient au niveau basal et maintient l'état levure [176]. (B) L'état de la chromatine sous le phénotype levure maintient inactive l'expression du gène *HPW1*, en occultant ses sites de liaisons au facteur de transcription Brg1. Le désassemblage des nucléosomes durant la phase d'induction permet l'accès temporaire aux sites de liaison de Nrg1 (vert) et Brg1 (rouge). Durant la phase d'extension, les nucléosomes se réassemblent, désencombrent le site de liaison de Brg1, et occultent celui de Nrg1 [176].

### Le programme auto-entretenu d'extension

Deux mécanismes moléculaires de maintenance sont décrits par Lu *et al.* et aboutissent tous deux à l'activation durable du facteur de transcription Ume6. Le mécanisme emprunté dépend du taux d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> dans l'environnement extracellulaire. Le premier repose sur la stabilisation de la protéine Ume6 (hypoxie et 5%CO<sub>2</sub>). Le second implique la réorganisation de la chromatine par le complexe Brg1-Hda1 [177]. L'ensemble de ces mécanismes et le modèle proposé par Lu *et al.* sont présentés Figure 1.12.

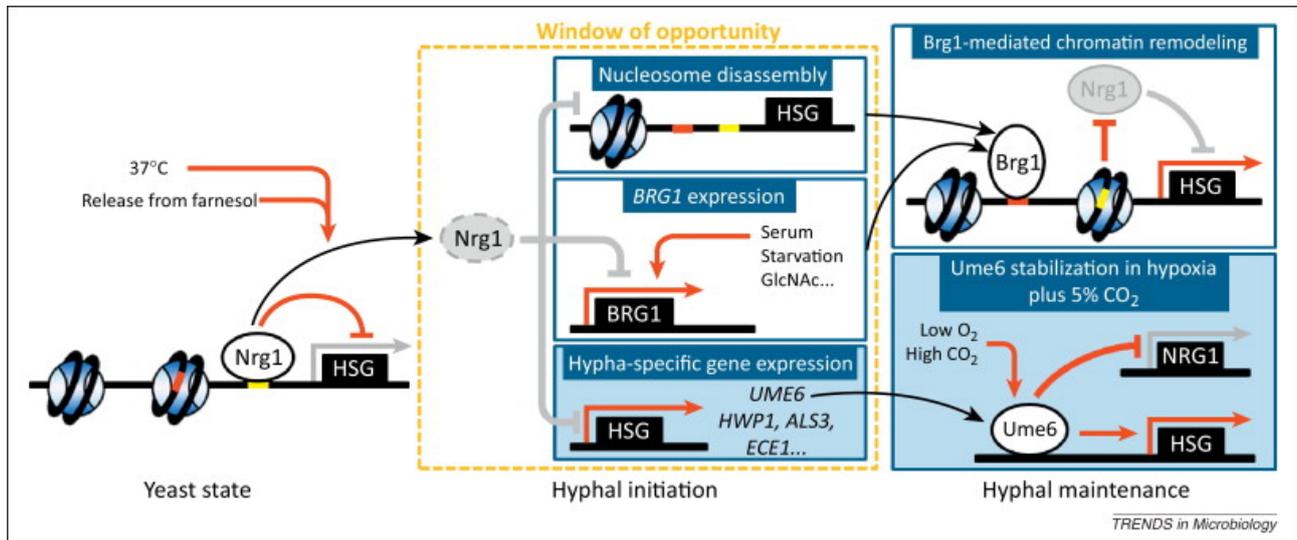


FIGURE 1.12 – Modèle de connexion temporelle entre la phase d'initiation (jaune) et la phase d'extension (bleu) ; et les différents mécanismes épigénétiques et transcriptionnels impliqués [177].

Si durant la fenêtre d'opportunité la concentration de CO<sub>2</sub> approche les 5%, le programme d'extension hyphal est directement soutenu par la stabilisation du facteur de transcription Ume6 (le mécanisme reste encore inconnu) [178]. Une fois stabilisée, la protéine Ume6 se lie à son propre promoteur, activant sa propre transcription et entretenant ainsi une boucle de rétroaction positive. Il réprime alors la transcription de *NRG1* et active celle des HAGs [18, 178, 177].

L'enzyme Ofd1 est sensible à l'oxygène et module aussi la stabilisation de Ume6 en fonction de la concentration d'O<sub>2</sub> détectée. En cas d'hypoxie, cette oxygénase n'impacte pas la protéine Ume6. Au contraire, lorsque la concentration en oxygène est supérieure à 0,2%, Ofd1 promeut la dégradation rapide de Ume6. Le programme de maintenance passe alors par un autre processus impliquant Brg1. Tout d'abord, Brg1 recrute l'histone désacétylase Hda1 aux sites de régulation des HAGs (dont lui-même). Ce complexe empêche ensuite la répression du programme d'extension, en repositionnant les nucléosomes qui viennent occulter les sites de liaison du répresseur Nrg1.

Les mutants ne produisant pas Hda1 ou Brg1 ne maintiennent pas la filamentation dans plusieurs conditions favorables à la filamentation [176] (voir Figure 1.13). Su *et al.* ont montré que la formation du complexe Brg1-Hda1 passe par l'inhibition de la voie Tor1 (*Target Of Rapamycin 1*) lorsque les cellules subissent une privation de nutriments. Cette réduction du signal Tor1 lève la répression de *BRG1* par Sko1 en inactivant la voie MAPK Hog1 [271].

Les travaux de Lu *et al.* suggèrent que ces deux voies fonctionnent en parallèle et que leurs fonctions dans l'élongation pourraient être redondantes. Seule une double délétion inactivant simultanément ces voies atténue significativement la virulence dans un modèle murin d'infection disséminée [178]. Ces travaux soulignent l'importance de la phase de maintenance de la croissance hyphale dans la virulence de *C. albicans*.

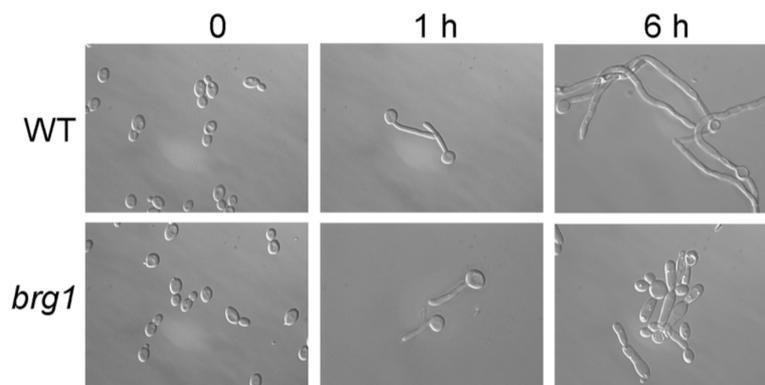


FIGURE 1.13 – Le mutant *brg1* $\Delta/\Delta$  est capable de former des hyphes à 37°C, mais leur croissance n’est pas maintenue sur plusieurs cycles cellulaires comme pour la souche sauvage (*WT*) malgré l’addition de rapamycine [176].

Martin *et al.* ont aussi découvert un autre facteur de transcription impliqué dans la maintenance du programme de filamentation. *Eed1* (*Epithelial Escape and Dissemination 1*) est réprimé par Tup1-Nrg1. En milieu inductif, les mutants *eed1* $\Delta/\Delta$  initient la filamentation et expriment des HAGs (*HWPI1*, *ALS3* notamment) mais la croissance des hyphes ralentit rapidement. Ces filaments arrêtent leur croissance polarisée et prolifèrent ensuite par bourgeonnement (voir Figure 1.14-A). Martin *et al.* suggèrent que le mécanisme d’extension requiert *Eed1* pour activer la production de *Ume6*, car l’expression ectopique de *UME6* supprime les défauts de filamentation du mutant *eed1* $\Delta/\Delta$  [186] (voir Figure 1.14-B). Polke *et al.* ont montré plus récemment que *Eed1* module aussi le programme de filamentation via la réponse à la molécule de *quorum-sensing* farnésol, interrogeant sur d’autres modes d’actions que les mécanismes proposés par Lu *et al.* [232] (nous reviendrons au farnésol dans la partie 1.2.5).

## 1.2.2 La température

*C. albicans* prolifère et développe des infections localisées dans différentes niches à différentes températures. Sur la peau, la température est d’environ 33°C, tandis que dans le corps humain, elle est de 37°C. La température joue un rôle important dans la morphogénèse via la protéine *heat-shock* Hsp90. La filamentation est favorisée à la température physiologique de 37°C et réprimée à des températures inférieures par cette protéine.

Hsp90 est une protéine chaperonne essentielle à tous les eucaryotes. Son activité concerne d’innombrables protéines auxquelles elle s’apparie. Son rôle principal consiste à contrôler la conformité des protéines produites dans la cellule, d’en réguler la conformation, et de signaler les défauts de repliements de protéines. Sa capacité à moduler l’activité de nombreux régulateurs cellulaires la place au centre de la transition de phénotypes.

Ainsi, chez les levures, elle est impliquée dans la réponse générale aux stress et a été initialement décrite dans la résistance aux antifongiques chez *C. albicans*. Elle contrôle de nombreuses voies de signalisation de la morphogénèse, principalement via la cascade de protéines kinases Ras1-cAMP-PKA. Elle interagit aussi avec la voie MAPK [245]. L’inactivation partielle de Hsp90 entraîne la filamentation dans différentes conditions *in vitro* favorables à la forme levure. D’autre part, la déplétion de Hsp90 atténue la virulence *in vivo* dans un modèle d’infection disséminée. Cela suggère qu’elle contribue à plusieurs processus de virulence au-delà de son rôle d’inhibiteur

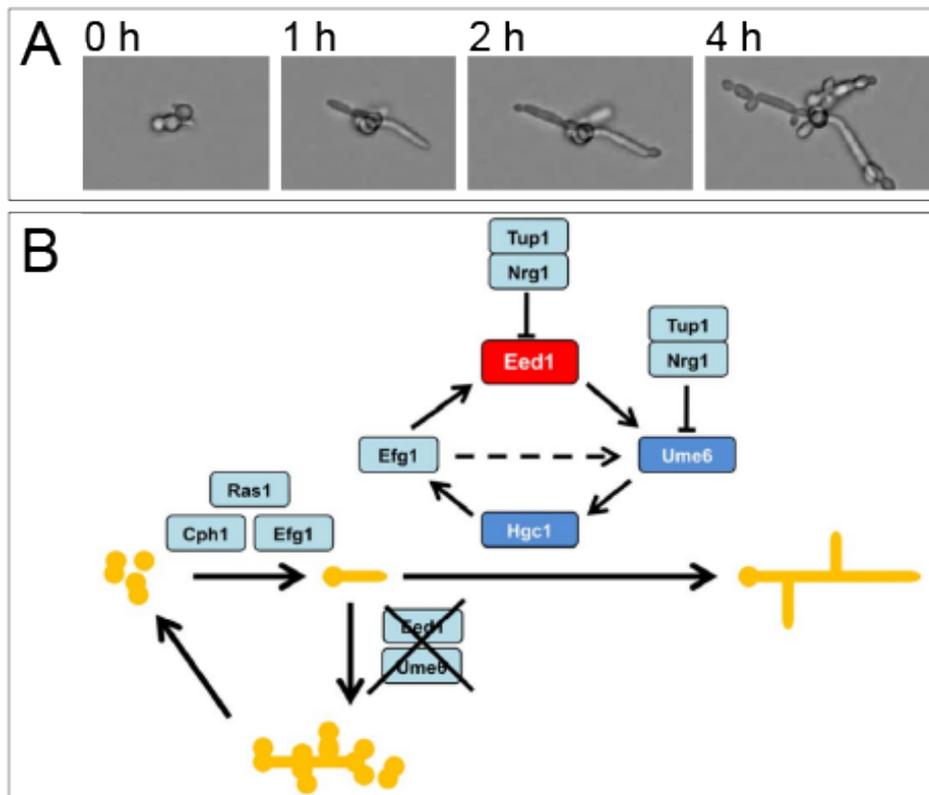


FIGURE 1.14 – (A) Le mutant *eed1Δ/Δ* est capable de former des hyphes en conditions inductives, mais leur élongation n'est pas maintenue après plusieurs cycles cellulaires. (B) Mécanisme de régulation de l'extension impliquant *EED1* proposé par Martin *et al.* [186].

de la transition [258].

Plusieurs études ont montré que l'élévation de la température à 37°C est nécessaire et suffisante à l'initiation de la filamentation en milieu liquide *in vitro* (voir Figure 1.15-A). Elle permet la levée d'inhibition de Hsp90 sur le programme morphogénétique via Nrg1 (voir Figure 1.15-B). En revanche, l'élévation de la température seule ne suffit pas au maintien de la croissance hyphale en milieu liquide, et nécessite généralement d'autres facteurs (pH alcalin, facteurs de croissance) [180]. *A contrario*, plusieurs groupes ont observé la croissance durable d'hyphes en milieu solide (milieux de culture en gélose d'agar) à température ambiante (<25°C) [322, 43]. Ce phénomène introduit l'importance des propriétés physiques de l'environnement dans la modulation de la filamentation et nous y reviendrons dans la dernière partie de cette introduction.

### 1.2.3 Le pH et la voie Rim101

#### Les morphotypes favorisés en fonction du pH

*C. albicans* est à l'origine d'infections dans des environnements de pH extrêmement variés *in vivo* : le sang (pH 7,4), l'estomac (pH 2) [323], la muqueuse orale (pH 6) [48], et vaginale (pH 4-5) [111]. La capacité du pathogène à répondre à ces différents pH fait partie des facteurs clés dans la virulence.

A des températures physiologiques (37°C), un pH neutre à alcalin (supérieur à 6) favorise la

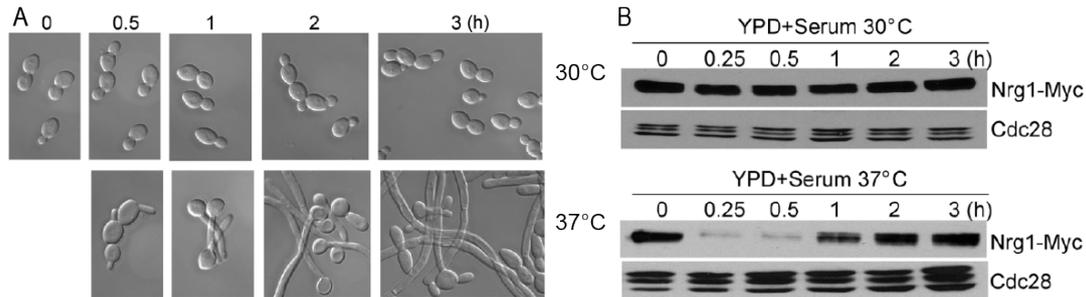


FIGURE 1.15 – (A) Effet de la température sur la morphologie de *C. albicans* en milieu liquide nutritif (YPD), adapté de Lu *et al.*. (B) Western blot présentant la quantité relative de Nrg1 après inoculation en milieu liquide avec sérum, à 30°C et à 37°C. La protéine Nrg1 est temporairement dégradée à 37°C (de 15 à 30 min) mais pas à 30°C malgré la présence de sérum [180].

transition levure vers hyphe. La filamentation est progressive et réprimée lorsque le pH devient inférieur à 6 et finalement, le phénotype levure prédomine largement en condition de pH acide proche de 4.

La morphogénèse n'est en réalité qu'une facette parmi les nombreuses fonctions physiologiques intégrant le pH comme l'adaptation du métabolisme ou la biogénèse de la paroi cellulaire. Par exemple, Sherrington *et al.* ont observé que la paroi cellulaire de *C. albicans* diffère selon le pH. A pH acide, la réorganisation de la paroi favorise l'exposition de  $\beta$ -glucanes à sa périphérie, quelque soit le morphotype de la cellule. Or les  $\beta$ -glucanes font partie des motifs spécifiques (PAMPs) reconnus par des cellules du système immunitaire comme les macrophages et les neutrophiles. Ils induisent une forte réponse pro-inflammatoire dans un modèle de colonisation vaginal murin [261].

## Les gènes impliqués dans la régulation par le pH

### La cascade de signalisation Rim101

C'est la voie de signalisation Rim101 qui régule la réponse au pH ambiant. Cette voie est conservée chez d'autres organismes dont la levure *S. cerevisiae*, chez qui elle contrôle la méiose et la croissance pseudo-hyphale. Le pH est intégré par deux récepteurs transmembranaires : Dfg16 et Rim21 [22, 105]. Lorsque le pH est alcalin, ces deux senseurs initient la signalisation protéolytique qui conduit au clivage du domaine C-terminal du facteur de transcription Rim101 par un complexe comportant Rim13 et Rim20 [168]. La forme clivée de Rim101 va ensuite activer le facteur de transcription Efg1, et plusieurs gènes associés aux hyphes. Enfin la protéine Rim8 joue aussi un rôle important puisqu'elle contribue à la répression du programme de transition via Rim101 sous pH acide [105]. Rim101 active également les gènes *PRA1* et *PHR1*, et réprime *PHR2*.

### L'expression bistable de PHR1 et PHR2

*PRA1* semble avoir un impact mineur dans la filamentation induite par pH alcalin. En revanche, Saporito *et al.* ont montré que le profil d'expression de *PHR1* et *PHR2* dépend fortement du pH et module la filamentation. Ces deux gènes codent pour des glycoprotéines qui sont ancrées dans la membrane plasmique. Ces enzymes participent à la réorganisation de la paroi cellulaire durant la morphogénèse, particulièrement à la réticulation des chaînes de  $\beta$  – (1,3) – glucanes composant la paroi hyphale [95].

Phr1 est produite à pH supérieur à 5,5. Elle est requise pour la maintenance de la croissance hyphale à pH alcalin. La délétion du gène *PHR1* diminue l'expression de gènes associées au hyphes tels que *HWPI* et *ECE1*. Cela entraîne des défauts de croissance et d'adhérence à pH alcalin [47]. Phr2 présente des fonctions similaires à Phr1, en revanche son expression n'est active que lorsque le pH est inférieur à 5,5 et les défauts induits par sa délétion ne sont visibles qu'à pH acide.

De Bernardis *et al.* ont aussi exploré l'importance de la régulation de ces gènes pour la virulence dans des niches de pH différents chez la souris. Ainsi le mutant *phr1* $\Delta/\Delta$  est avirulent dans un modèle d'infection systémique (pH sanguin 7,4) mais conserve sa virulence dans un contexte d'infection vaginale (pH~4,5). Le comportement du mutant *phr2* $\Delta/\Delta$  est diamétralement opposé, sa virulence est uniquement limitée dans les tissus vaginaux [70].

### 1.2.4 Facteurs de croissance et oxygène

Le terme *métabolisme* regroupe l'ensemble des fonctions qui ont trait à la conversion de l'énergie entrante (nutriments), en énergie exploitable (molécules d'ATP), et en molécules nécessaires au fonctionnement de la cellule. L'accès et l'utilisation des nutriments est essentiel à la prolifération des organismes vivants qui évoluent et s'adaptent aux sources disponibles dans leur environnement. Par exemple, la levure *S. cerevisiae* utilise préférentiellement la glycolyse dans un milieu riche en glucose (fermentation), mais repose sur la respiration mitochondriale et sur la biosynthèse de sources azotées en cas de déprivation de glucose sous aérobie [282].

L'accès à certains nutriments (sources de carbone et sources d'azote) font aussi partie des stimuli majeurs favorables à la morphogénèse chez *Candida*, quelques exemples sont donnés *in vitro* par Lu *et al.* Figure 1.16.

La restriction en glucose, acides-aminés et en sources azotées (ammonium) favorise la filamentation. Les sources de carbone, dont le glucose, constituent une ressource énergétique commune à de nombreux organismes. Chez *S. cerevisiae* la détection du glucose est assurée par des protéines transmembranaires de la famille des GPCRs : Gpa2/Gpr1. Ces protéines activent la voie cAMP-PKA en réponse à la présence de glucose, et augmentent le niveau de cAMP cytoplasmique ce qui initie la filamentation

Chez *C. albicans*, l'inactivation de protéines en lien avec la signalisation du glucose comme Ras1, Cdc25 ou Rgt1, limite fortement la filamentation habituellement observée en conditions de privation (milieu *Spider*). La production de protéines spécifiques aux hyphes (Hwp1, Ece1) est aussi réduite.

Un autre cas de limitation du glucose est l'utilisation de N-acétylglucosamine (GlcNAc) comme seule source carbonée. La GlcNAc est un sucre dont la présence favorise la filamentation selon plusieurs voies : via Cph1 et via Ras1 (cAMP-PKA). Des concentrations milimolaires suffisent (2,5 mM) et il est détecté par la protéine Ngt1 localisée sur la membrane plasmique. Cette voie de signalisation pourrait être impliquée dans la survie à la phagocytose puisque Ngt1 est recrutée durant ce processus [9].

Des protéines transmembranaires (Gap1 et Csy1) assurent la détection d'acides aminés comme l'histidine. La protéine Gap1 joue aussi un rôle dans la réponse au N-acétylglucosamine, et à la limitation en azote. Le mutant *gap1* $\Delta/\Delta$  est déficient pour la filamentation dans tous ces contextes [34]. La limitation en méthionine (un acide aminé) enclenche aussi la morphogénèse via (Gpr1/Gpa2) [199, 183].

La limitation de l'azote disponible dans l'environnement est aussi un facteur déclencheur de la morphogénèse. Par exemple, la croissance hyphale est favorisée sur des milieux limités en azote

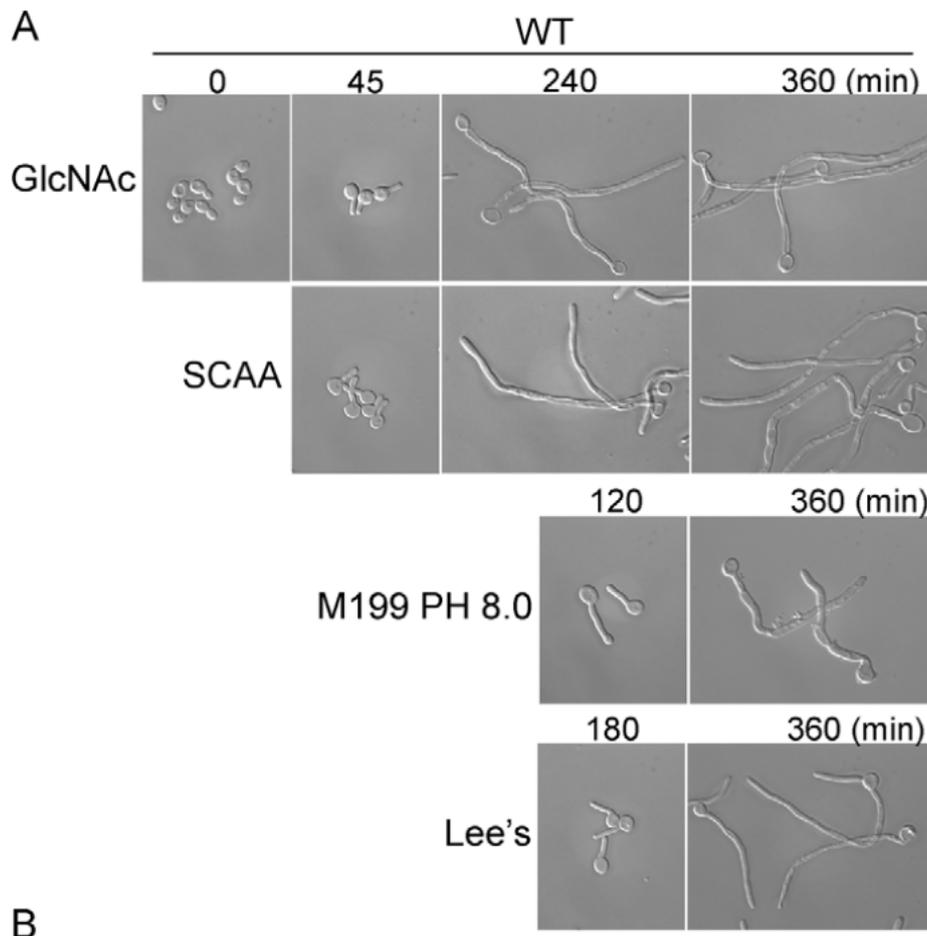


FIGURE 1.16 – Effet des sources de nutriments sur la morphologie de *C. albicans* en milieu liquide à 37°C. Effet de la limitation en acides aminés, en glucose, et en azote avec différents milieux [180]. GlcNAc : milieu synthèse avec N-acétylglucosamine comme source de carbone principale; SCAA : milieu synthétique complet avec acides aminés; M199 : milieu minimal sans acides aminés, 1% glucose; Lee's : acides aminés comme source de carbone principale

(milieu SLAD, 100  $\mu\text{M}$  d'ammonium  $\text{NH}_4^+$ ). Chez *Candida*, les dérivés azotés sont détectés via les protéines transmembranaires Mep1 et Mep2. L'activation de Mep2 enclenche la réponse morphogénétique via la cascade de signalisation cAMP-PKA via Ras1, et la voie MAPK via Cph1. Lorsque l'ammonium (source d'azote) est présent en grandes quantités (10 mM), la transition levure vers hyphe est au contraire réprimée même en cas de déprivation d'acides aminés, mais pas en présence de sérum [32].

Plusieurs modèles d'infection soulignent l'importance du fer comme facteur de croissance chez *C. albicans*. Par exemple les faibles quantités de fer soluble *libre* présentes dans le foie modulent la réponse du pathogène. Pour répondre à ces contraintes, les hyphes sont capables de capter la ferritine stockée dans les cellules sanguines ou épithéliales comme source fer, via plusieurs protéines de la paroi cellulaire comme Als3 et Rtb5 [300]. Les tissus épithéliaux riches en ferritine sont ainsi plus vulnérables à l'invasion hyphale [3].

La molécule rapamycine est une molécule produite par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* qui inhibe la transition levure vers hyphe chez *C. albicans* en réprimant l'activité de la voie TOR (*Target Of Rapamycin*). Elle bloque la filamentation dans plusieurs conditions sur milieux solides

*in vitro* (limitation d'ammonium (SLAD), de glucose (Spider), milieu alcalin). En revanche, la rapamycine ne semble pas réprimer la filamentation en milieu liquide et stimule l'extension [65].

*C. albicans* module également la morphogénèse en réponse à l'hypoxie (faible concentration d'oxygène) à travers le régulateur central de la transition, Efg1. En condition d'hypoxie, ce facteur de transcription agit comme répresseur tandis qu'il active la filamentation en présence d'oxygène [81, 257, 118]. Cette dualité de Efg1 suggère l'adaptation aux environnements rencontrés *in vivo*. Plusieurs études ont montré que les mutants *efg1Δ/Δ* sont très peu virulents dans des modèles d'infection disséminée par voie vasculaire. En revanche, ils colonisent plus facilement l'appareil intestinal, une niche pauvre en oxygène [302, 29].

Finalement, un facteur très souvent utilisé pour induire une filamentation robuste *in vitro* est l'addition de sérum au milieu de culture, qui contient de nombreux facteurs de croissance pour les cellules animales. L'espèce chimique spécifique qui est responsable de la réponse morphogénétique correspond à un peptidoglycane bactérien [313]. L'initiation sous sérum reste cependant conditionnée par l'élévation de la température (voir Figure 1.17). Le sérum active en effet la voie cAMP-PKA via Ras1 placée sous contrôle de la protéine Hsp90 [90]. Le sérum active la filamentation même lorsqu'il est ajouté dans un milieu riche en carbone et en azote, l'efficacité de transition de la population dépend de la concentration en sérum [182].

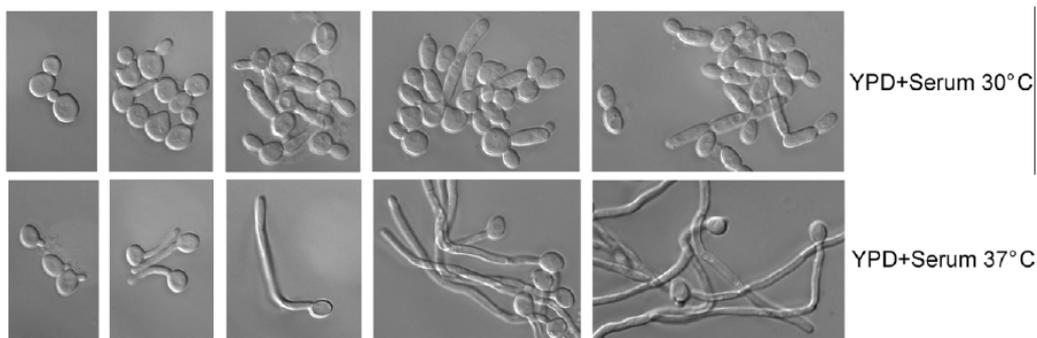


FIGURE 1.17 – Transition morphologique de *C. albicans* en milieu liquide riche (YPD) en présence de sérum (10%) à 30°C et à 37°C. Le sérum maintient l'élongation sur plusieurs cycles cellulaires (6h) à 37°C, mais ne permet pas à lui seul l'initiation à 30°C [180].

### 1.2.5 Le *quorum-sensing*

Le *quorum-sensing* est un mécanisme de communication inter-cellulaire médié par la sécrétion de molécules de faible poids moléculaire diffusant dans le micro-environnement. Les modes de sécrétion et les fonctions des molécules de *quorum-sensing* sont bien connus chez les bactéries. Ces molécules endogènes ont un rôle protecteur de la population microbienne, elles permettent aussi de réguler de très nombreux processus physiologiques et modulent la croissance. Ces molécules coordonnent l'expression des gènes à l'échelle de la population : leur concentration est corrélée à la densité de la population, et lorsqu'elle dépasse un certain seuil, elle déclenche ou réprime l'expression de certains gènes [195, 239]. Le *quorum-sensing* joue un rôle crucial dans les interactions inter-espèces du microbiote et participe au maintien de l'homéostasie des différentes populations [82].

Comme nous l'avons expliqué partie 1.1.1, *C. albicans* occupe des niches telles que le système gastro-intestinal dans lesquelles il cohabite avec d'autres espèces du microbiote. Plusieurs bactéries à Gram négatif produisent des molécules qui répriment la filamentation et participent au

maintien à l'état commensal de *C. albicans* [217, 82]. La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* sécrète une homosérine-lactone [122], les bactéries *Xanthomonas campestris*, *Burkholderia cenocepacia* et *Streptococcus mutans* du dodécanol, qui bloquent la transition chez *C. albicans* [35, 285, 295]. À l'inverse, le surnageant issu des cultures de *Streptococcus. gordonii* semble amplifier la filamentation et la formation de biofilms [17]. *S. gordonii* et *C. albicans* sont d'ailleurs capables de synergie et forment des biofilms multi-espèces [240, 201].

Le *quorum-sensing* a longtemps été vu comme une spécificité des biofilms bactériens. Cependant, des mécanismes similaires ont été découverts il y a une vingtaine d'années chez *C. albicans*, médiés par deux molécules : le *farnésol* et le *tyrosol*. Elles sont particulièrement intéressantes car elles modulent toutes les deux la morphogénèse et participent aux mécanismes de virulence [125, 2].

## Le farnésol

### Sécrétion, activité et fonctions du farnésol

Le farnésol est un alcool acyclique sesquiterpène produit de manière endogène par *C. albicans*. Il est classé comme molécule de *quorum-sensing* car il s'accumule dans le micro-environnement avec l'augmentation de la densité de cellules. Cette molécule régule de nombreuses fonctions physiologiques et la résistance au stress, comme la résistance aux antibiotiques, la maintenance du mur cellulaire, la métabolisation du fer et les réponses *heat-shock* [87, 279]. Le farnésol antagonise aussi la prolifération d'autres levures, participant à la compétition au sein du microbiote. Par exemple, 100  $\mu\text{M}$  de farnésol suffisent à déclencher l'apoptose chez *Aspergillus nidulans*, un autre pathogène fongique humain [255].

Le farnésol est particulièrement étudié pour son rôle d'inhibiteur de la transition levure vers hyphes, et l'importance de cette inhibition est corrélée à sa concentration. Initialement, le lien de cette molécule avec la morphogénèse a été indirectement montré par "*l'effet de la taille d'inoculation*". En effet plusieurs études ont montré un phénomène de dépendance, entre la densité cellulaire initiale diluée dans le milieu de culture *in vitro*, et la morphologie levure-mycélium qui en découle [159, 124, 31, 128]. Ainsi, bien que l'ensemble des autres paramètres (pH, température, composition du milieu) restent constants et peu permissifs à l'induction, différents groupes ont observé la production d'hyphes suivant l'inoculation à  $\leq 10^6$  cellules par millilitre.

Cet effet a également été observé chez *C. albicans* en utilisant le surnageant de cultures en milieu liquide parvenues à différentes densités. La proportion de cellules formant des hyphes décroît avec le pourcentage final de surnageant ajouté dans le milieu de dilution (voir Figure 1.18-A).

Hornby *et al.* ont émis l'hypothèse que cet effet est relié à une molécule active, accumulée durant la culture, dont ils en ont déduit l'identité par spectroscopie de masse (GC-MS). Les résultats obtenus ont révélé une structure et une composition identique à celle d'un échantillon commercial de (E,E)-farnésol ( $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ ; poids moléculaire 222,37 g/mol) [125]. Ils ont ensuite pu vérifier l'efficacité du (E,E)-farnésol à bloquer la filamentation dans différentes conditions de culture (L-proline, N-acétylglucosamine, sérum).

Le farnésol est une molécule lipophile soluble dans des solvants organiques, mais peu soluble dans l'eau [125]. Elle est sécrétée par les cellules comme sous-produit de la synthèse de stérol via l'enzyme pyrophosphatase Dpp3 [316, 126]. Le taux de sécrétion de cette molécule a été évalué dans plusieurs études, principalement par titration en spectroscopie de masse (GS-MS). Les résultats varient d'un génotype à l'autre et selon les conditions physico-chimiques (température, composition du milieu). Kebaara *et al.* évaluent l'accumulation de farnésol à  $1,6 \pm 0,36 \mu\text{g}$  par

gramme de cellules sèches en 24 h [145]. Ces groupes estiment ainsi que les cultures parvenues en phase stationnaire accumulent des concentrations de farnésol à hauteur de 2 à 4  $\mu\text{M}$ .

L'étude de Mosel *et al.* suggère que le farnésol agit sur la morphogénèse principalement en bloquant la phase d'initiation. En revanche, lorsque les cellules sont engagées dans la phase de maintenance, la croissance des hyphes ne serait plus réprimée par le farnésol. Cet effet "d'engagement" est illustré par la figure 1.18-B. Lorsque du farnésol (à 30  $\mu\text{M}$ ) est ajouté immédiatement dans le milieu inductif alors 100% de la population observée reste dans l'état levure. Cependant, lorsque la même quantité de farnésol est ajoutée 90 minutes plus tard (la durée approximative d'un cycle cellulaire), 100% de la population produit des hyphes [203].

Plusieurs autres études ont observé qu'une concentration de 1-30  $\mu\text{M}$  suffit pour ramener la proportion d'induction dans la population de 100% à 50% [87, 203]. L'étendue de cette gamme reflète les différents stress inductifs utilisés. En particulier, la concentration inhibitrice de farnésol augmente quasi-linéairement avec le pourcentage de sérum ajouté au milieu inductif à 37°C [203]. Mosel *et al.* suggèrent que cet effet résulte du caractère lipophile du farnésol. Il pourrait s'attacher de manière non-spécifique à l'albumine présente dans le sérum via des liaisons lipidiques, atténuant indirectement son efficacité.

En complément, l'étude de Hornby *et al.* a aussi montré que la croissance de *C. albicans* n'est *a priori* pas limitée en présence de farnésol, du moins jusqu'à des concentrations de  $\sim 250 \mu\text{M}$  pour lesquelles des cellules produisant des bourgeons sont encore observables [125, 237]. Cet effet est peut être aussi concentration-dépendent puisque Kim *et al.* ont mesuré une inhibition de la croissance chez 35% de la population à 450  $\mu\text{M}$  de farnésol [146].

Le farnésol aurait également un impact dans le développement de biofilms comme inhibiteur durant la phase d'initiation. Tout d'abord, en bloquant la transition levure-hyphe, il réduit aussi l'adhérence des cellules au substrat empêchant l'initiation d'une structure dense (voir Figure 1.18-C) [237]. Le farnésol impacterait aussi la transition hyphe-levure. En effet les hyphes soumis à des concentrations croissantes de farnésol produisent une plus grande quantité de levures latérales (voir Figure 1.19-A). Ce mécanisme de régulation pourrait être important pour la dissémination qui suit la formation de biofilms matures [2].

### Réponses au farnésol et cascades de signalisation

Le mécanisme par lequel le farnésol extracellulaire est détecté n'a pas encore été élucidé [231]. La protéine Chk1 participe à la transduction signalétique répondant au farnésol, et Kruppa *et al.* ont montré que les mutants dépourvus de cette kinase sont capables de filamenter en présence de quantités inhibitrices (250 $\mu\text{M}$ ) de farnésol (voir Figure 1.19-B). En revanche cette protéine cytoplasmique ne présente aucun motif de liaison au farnésol, et Kruppa *et al.* suggèrent que d'autres protéines se trouvent en amont de Chk1 dans cette cascade signalétique [158].

En utilisant des dérivés fluorescents du farnésol, Schepin *et al.* ont observé que ceux-ci s'accumulent dans les noyaux cellulaires [259]. Il est donc possible que, de par son faible poids moléculaire, le farnésol diffuse jusqu'au noyau et se lie à un récepteur nucléaire, affectant directement l'expression de certains gènes (voir ci-après). Il est également possible que le farnésol agisse au niveau de la paroi cellulaire et soit détecté par des récepteurs spécifiques : l'efficacité réduite d'analogues du farnésol sur l'inhibition de la transition va dans ce sens [162, 259].

Plusieurs cascades de signalisation modulent la morphogénèse en réponse au farnésol. La plus décrite est la voie signalétique Ras/cAMP/PKA qui est inactivée en présence de farnésol, diminuant le niveau intracellulaire de cAMP [125, 180]. Or, c'est l'activation de cette voie et l'augmen-

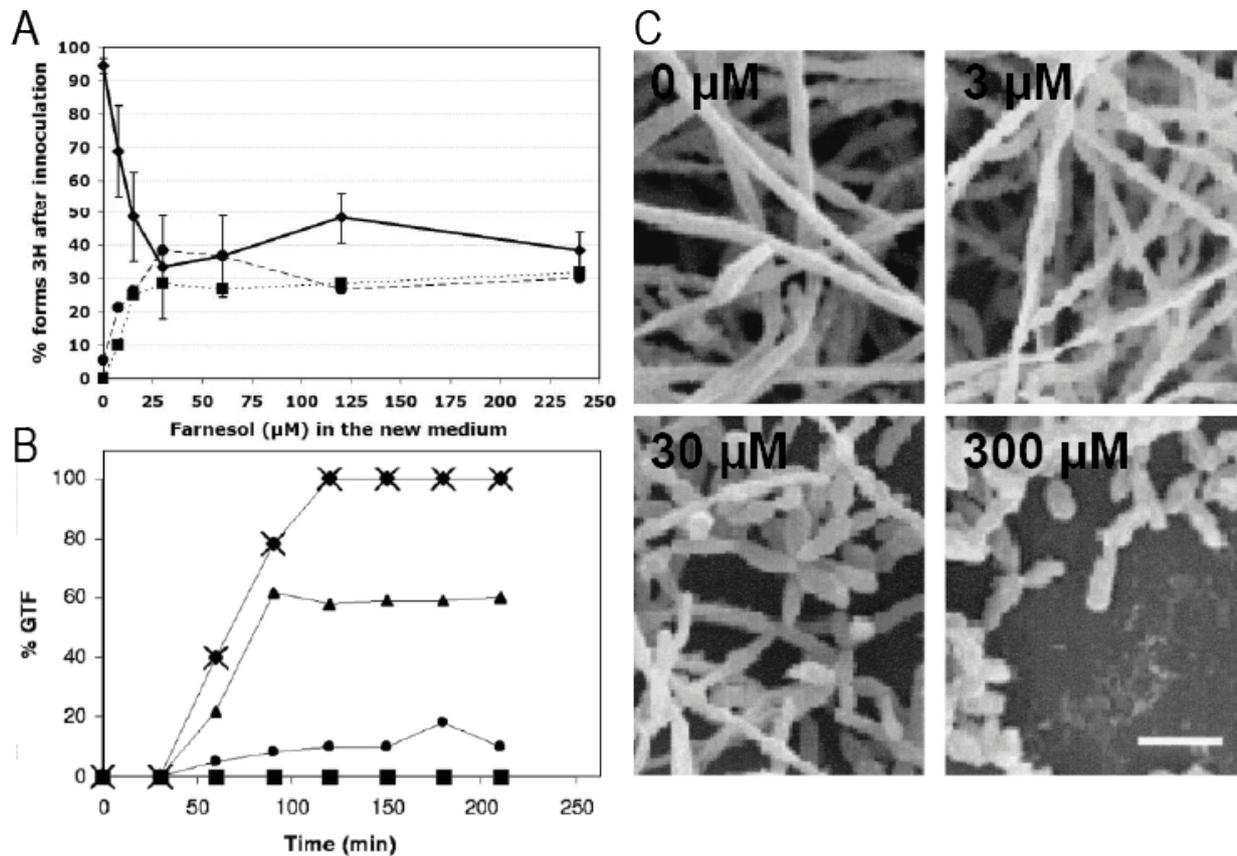


FIGURE 1.18 – (A) Pourcentage de cellules formant des hyphes (◆), des pseudo-hyphes (■) et des levures (●) après inoculation à 37°C en fonction de la concentration de farnésol exogène [87]. (B) Taux de transition levure vers hyphe lors de l'addition de 30 µM farnésol après différents délais ((×) contrôle sans addition, addition à (■) 0 min, (●) 30 min, (▲) 60 min, et (◆) 90 min). Lorsque le farnésol est ajouté immédiatement dans le milieu stimulant l'induction, les cellules restent toutes dans l'état levure. Elles deviennent progressivement insensibles à l'effet inhibiteur du farnésol lorsqu'il est ajouté après un délai [203]. (C) Aspects de biofilms en présence de différentes concentrations de farnésol (0, 3, 30 et 300 µM) après 24 h d'adhérence vus au microscope électronique à balayage. Barre d'échelle 10 µm [237].

tation du niveau de cAMP qui permettent de dégrader le répresseur Nrg1 et d'initier la transition levure-hyphe (voir partie 1.2.1) [180]. Lu *et al.* ont déterminé que la présence de farnésol (30µM) bloque la diminution d'expression de Nrg1 durant l'initiation. Ces résultats peuvent par ailleurs être mis en regard des observations de Mosel *et al.* qui font transparaître ce mécanisme "d'engagement" et de maintenance (Figure 1.18-B). En parallèle, Lindsay *et al.* ont montré que la diminution du niveau de cAMP via le farnésol promeut la production de levures latérales [171].

Au moins deux autres modes d'action du farnésol ont été décrits. Premièrement, le niveau d'expression du répresseur Tup1 augmente avec la quantité de farnésol [144]. Il bloque aussi la dégradation de Nrg1 par Sok1 [179]. Enfin, le farnésol contrôle la morphogénèse en modulant l'activité d'autres facteurs de transcription tels que Efg1 et Czf1 [40, 145, 163], et en activant la kinase de réponse au stress osmotique Hog1 qui inhibe la transition [264]. Cependant ces autres mécanismes de régulation n'ont pas encore été éclaircis. Par exemple, les mutants ayant une délétion de *TUP1*, *NRG1* ou encore *EED1* sécrètent significativement plus de farnésol (~ 20 fois), pourtant le niveau

d'expression de *DPP3* (impliqué dans sa synthèse) n'augmente pas chez ces mutants. Tandis que les mutants *nrg1Δ/Δ* et *tup1Δ/Δ* sont insensibles au farnésol [40, 145], le mutant *eed1Δ/Δ* présente une hypersensibilité au farnésol. Polke *et al.* suggèrent que ce facteur de transcription participe à la régulation de la transition réversible levure-hyphe et hyphe-levure (voir Figure 1.19-C) [232].

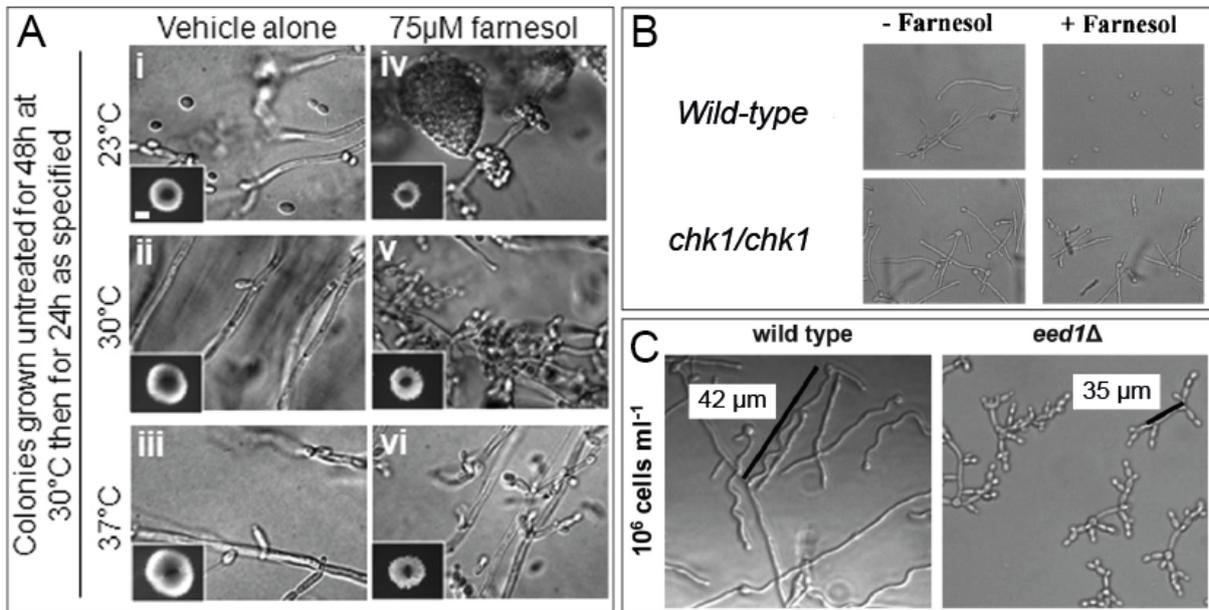


FIGURE 1.19 – (A) Effet de l'addition de farnésol sur la production de levures latérales. Les encarts montrent l'aspect macroscopique des colonies cultivées en milieu solide (gel d'agar). Notons que l'effet du farnésol sur la production de levures latérales est amplifié à température ambiante (23°C) [170]. (B) Le farnésol (250µM) bloque la filamentation chez la souche sauvage CAF2-1 mais pas chez le mutant *chk1Δ/Δ*. Les conditions d'induction utilisées ici sont : croissance pendant 4 h à 37°C dans du milieu minimal 199 (pH7,5) [185]. (C) Le farnésol module la maintenance de la croissance hyphale et la transition hyphe-levure via le facteur de transcription Eed1. Le mutant *eed1Δ/Δ* est hypersensible et réverte en présence de farnésol. Les nombres indiquent la longueurs moyennes de hyphes après 8 h de culture [232].

## Le tyrosol

*C. albicans* secrète une autre molécule de *quorum-sensing*, dérivée de la tyrosine, le tyrosol (2-[4-hydroxyphenyl] éthanol). Chen *et al.* ont observé que l'ajout de tyrosol exogène dans le milieu de culture diminue le délais d'entrée en morphogénèse après inoculation de cellules en phase stationnaire. Ils suggèrent que le tyrosol stimule la croissance hyphale. Ce groupe a également mesuré la concentration du tyrosol présent dans le surnageant de cultures à différentes densités. Elle augmente avec la densité de cellules et parvient à ~ 3 µM en 24 h, confirmant l'activité de *quorum-sensing* chez cette molécule [53]. En revanche, Nickerson *et al.* ont estimé qu'en concentration similaire, le tyrosol ne compense pas l'activité inhibitrice du farnésol. En réalité, cette molécule est considérée comme mineure dans l'activité de *quorum-sensing* sur la morphogénèse. Elle n'aurait un impact significatif qu'en présence de quantités très limitées de farnésol [215]. Sebaa *et al.* proposent aussi que le tyrosol favorise la formation de biofilms *in vitro* sur une surface abiotique, en promouvant l'adhérence et en accélérant la vitesse d'extension hyphale [2, 251].

## 1.3 Croissance et division cellulaire

Après cet aperçu des nombreux procédés moléculaires qui régulent la morphogénèse *levure-hyphes* en réponse aux micro-environnements rencontrés, nous nous intéressons dans cette partie aux mécanismes de croissance et de division. Pour cela, nous nous appuyerons sur des observations générales établies chez d'autres organismes modèles comme *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. Nous commencerons par quelques concepts autour de la division cellulaire, puis nous décrirons la croissance et, particulièrement, les principaux mécanismes orchestrant la croissance polarisée des hyphes chez *C. albicans*.

### 1.3.1 Concepts généraux de croissance et division

#### La division cellulaire

Lorsque les conditions physico-chimiques de l'environnement sont favorables à leur prolifération, les cellules se multiplient et produisent de nouvelles cellules. Les modes de reproduction diffèrent d'un organisme à l'autre, mais ils ont tous en commun le processus de réplication du matériel génétique (ADN) puis la séparation des cellules "mère" et "fille". Chez la levure, on retrouve essentiellement deux voies de réplication : sexuée et asexuée.

La voie de reproduction sexuée a été caractérisée depuis longtemps chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*. Elle se déroule en deux grandes étapes : la différenciation sexuelle de deux cellules haploïdes (dénommées  $a$  et  $\alpha$  chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*) et l'entrée dans le cycle de division méiotique donnant naissance à une cellule fille diploïde ( $a/\alpha$ ).

*C. albicans* a longtemps été considéré comme un organisme diploïde obligatoire. Cependant de nombreuses études ont révélé l'existence d'un cycle de reproduction dit "parasexuel" qui passe par le phénotype *opaque* que nous avons brièvement évoqué dans la partie 1.1. Ce mécanisme et son utilité dans les modes de vie de *C. albicans* restent encore peu décrits et nous resterons ici focalisés sur le cycle asexué du phénotype *blanc*.

La reproduction asexuée chez la levure consiste en la duplication du matériel génétique de la levure mère qui est directement transmis à la fille. On parle ainsi de reproduction par clonage car le matériel génétique n'est pas modifié d'une génération à l'autre. La multiplication des cellules par clonage entraîne l'augmentation de leur nombre au cours du temps. Chez les organismes unicellulaires cette augmentation est généralement exponentielle avec un taux caractéristique  $k_{\text{division}}$ , qui décrit l'augmentation du nombre de cellules par unité de temps.

Notons aussi que la division cellulaire s'achève par la cytokinèse<sup>5</sup> suivie de la septation qui sépare les cellules en deux compartiments distincts comportant chacun un seul noyau. Chez les organismes unicellulaires, la septation est généralement complète. Les cellules se détachent les unes des autres en laissant des cicatrices au niveau de la paroi cellulaire (*bud-scars*). Notons cependant que chez certains *fungi*, la septation est incomplète voire inexistante. Par exemple chez *Aspergillus nidulans*, plusieurs noyaux sont libres de circuler le long des filaments composant le mycélium [307].

5. Séparation du cytoplasme entre la cellule mère et la cellule fille.

## La croissance cellulaire

La croissance cellulaire désigne l'ensemble des processus par lequel une cellule augmente sa biomasse. En effet, les cellules augmentent leur volume avant de se diviser afin de conserver une taille moyenne constante au fil des générations. La croissance est généralement caractérisée par le taux d'augmentation du volume cellulaire au cours du temps  $k_{\text{growth}}$ , mais sa mesure peut s'avérer complexe selon la géométrie de l'organisme.

Plusieurs études, dont récemment Alric *et al.*, proposent qu'il existe un lien entre l'augmentation du volume et l'augmentation de la biomasse. En effet, la croissance passe par la production des briques élémentaires nécessaires notamment à la construction des différents constituants du cytoplasme, mais aussi à l'extension de la paroi cellulaire. L'homéostasie cellulaire passe donc aussi par le maintien des constituants macromoléculaires autour d'une concentration constante. Cette homéostasie est notamment modulée par un mécanisme biophysique, l'encombrement macromoléculaire, que nous présenterons plus en détails dans la partie 1.4 [7].

## Coordination entre croissance et division

La prolifération des cellules passe donc par la croissance (augmentation de volume) et la division (réplication de l'ADN et séparation). Croissance et division sont coordonnées pour assurer en moyenne que  $k_{\text{growth}} = k_{\text{division}}$ . Les mécanismes qui coordonnent ces deux aspects sont très étudiés, et les levures constituent des organismes modèles dont la manipulation génétique permet de disséquer les nombreux processus de régulation.

Ainsi, la progression dans le cycle cellulaire se découpe en différentes étapes. Elle est orchestrée par plusieurs points de contrôles ("*checkpoints*") qui permettent ou répriment le passage entre ces phases [250, 112]. Chez la levure, le cycle cellulaire présente quatre phases. La cellule mère commence par accumuler de la biomasse (synthèse de protéines, production d'organelles) et augmente son volume par l'extension de sa paroi, c'est la phase  $G_1$ . Durant la phase suivante (S) la cellule synthétise et duplique son ADN, tout en augmentant encore sa masse. Lorsque l'ADN est entièrement dupliqué, la cellule passe en phase  $G_2$  et se prépare à entrer en mitose qui correspond à la dernière phase (M). Les chromosomes dupliqués se séparent en deux noyaux distincts et migrent activement dans leurs cellules respectives en parallèle de la cytokinèse [13].

Notons que les points de contrôle de taille de la cellule durant son cycle divergent d'un organisme à l'autre. Par exemple, la levure *S. cerevisiae* croît exponentiellement et prolifère par bourgeonnement de manière asymétrique. Ainsi chaque cellule fille a un volume plus faible à sa naissance (septation) que celui de sa mère. Le contrôle de la taille s'effectue en majeure partie durant la phase  $G_1$ , les cellules mères et filles vont donc passer plus ou moins de temps dans cette phase jusqu'à avoir accumulé un volume suffisant pour entrer en phase S (voir Figure 1.20 à droite).

*A contrario*, la levure à fission *S. pombe* croît de manière linéaire et le contrôle en taille intervient principalement durant la phase  $G_2$  qu'elle ne quitte qu'après avoir atteint un volume critique (voir Figure 1.20 à gauche). De plus, leur croissance est symétrique, les cellules filles ont la même taille que leur mère à la naissance (i.e. après septation, en phase S). Chez le premier organisme, le contrôle de la taille s'effectue principalement avant la réplication de l'ADN et chez le second après.

Finalement, la durée et la prédominance des phases du cycle varient selon l'organisme. Nous pourrions également nous interroger sur la modulation de ces mécanismes entre les phénotypes d'un même organisme. *C. albicans* présente une grande variété de morphotypes et peut constituer un modèle intéressant pour cette étude.

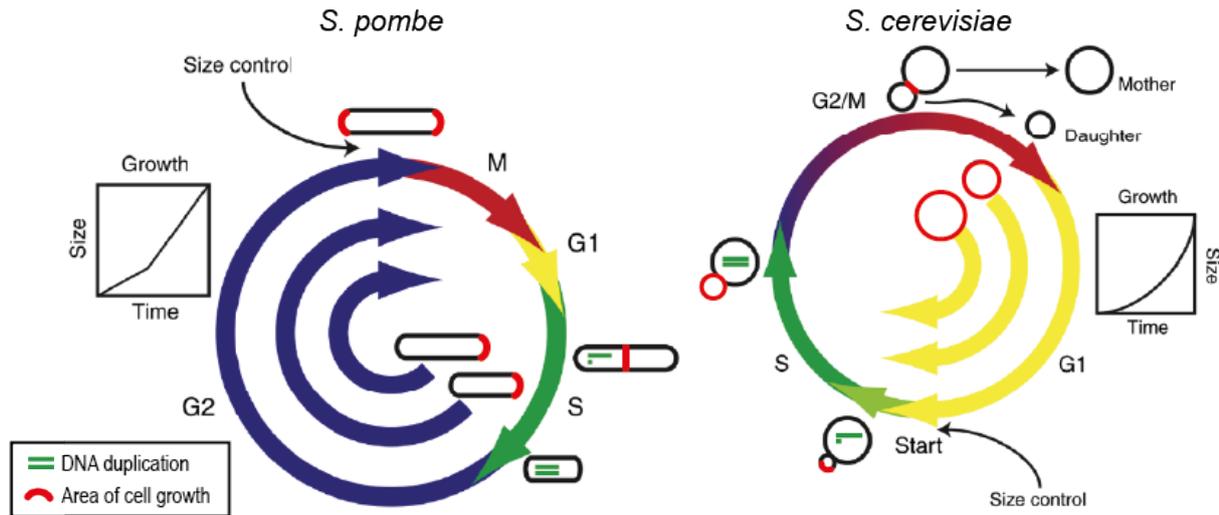


FIGURE 1.20 – Schéma des cycles de division chez la levure à fission *S. pombe* et de la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*. Les phases de réplication de l'ADN sont indiquées en vert, les sites de croissance sont indiqués en rouge. Adapté des illustrations de Pruyne *et al.*, et Turner *et al.* [233, 277].

#### Progression dans le cycle chez la levure et l'hyphe

Nous allons maintenant décrire la dynamique de progression du cycle cellulaire et ses événements clés chez les différentes morphologies de *C. albicans*.

Les levures et les pseudo-hyphes de *C. albicans* ont un cycle similaire à *S. cerevisiae*. En revanche, Berman *et al.* suggèrent que les événements se déroulent différemment lors de l'émergence d'un hyphe. Ces étapes sont schématisées Figure 1.21.

Dans le cas des levures bourgeonnantes, la cellule débute son cycle en  $G_1$ . Lorsqu'elle acquiert une taille critique elle initie la formation d'un anneau de septines, qui marque le futur site de croissance du bourgeon. Cet anneau de septines reste localisé au niveau de la constriction tout au long du cycle. Les sites de nucléation de l'actine et les patches corticaux se polarisent aussi au site d'émergence. Passé ce point de contrôle (appelé "START") la cellule entame son engagement en phase S.

Le début de la phase de synthèse (S) coïncide avec l'émergence du bourgeon fille et la duplication du *spindle pole body*<sup>6</sup>. Pendant la phase S, les microtubules tractent le noyau jusqu'au point de constriction formé par l'anneau de septines. Durant cette étape, le site de biogénèse de la paroi est d'abord très localisé et la croissance du bourgeon est fortement polarisée. Les câbles d'actine, supports du transport de vésicules, s'alignent dans l'axe de croissance distal-apical en travers de la constriction. Les patches corticaux d'actines s'accumulent au site de croissance où ils participent à l'endocytose nécessaire à la biosynthèse du mur. En parallèle, l'anneau de septines se renforce et enserre le bourgeon émergent pour maintenir la constriction qui deviendra plus tard le site de septation.

Tout au long de la phase  $G_2$ , les complexes de polarité et de biosynthèse de la paroi et les patches corticaux d'actine se répartissent progressivement sur l'ensemble de la paroi du bourgeon et la croissance devient isotrope.

6. Le *spindle pole body* est le centre organisateur des microtubules chez la levure, équivalent au centrosome chez les cellules mammifères, il orchestre la formation du fuseau mitotique qui permet le déplacement des chromosomes lors de la mitose.

Finalement, la cellule entre en l'étape d'anaphase de la mitose : les noyaux se séparent le long du complexe mitotique (microtubules) qui s'allonge fortement en travers du pré-septum avant de se séparer à son tour. Pendant ce temps, les complexes de polarisation (Bni1) et Cdc42 sont recrutés au niveau de la constriction avec les patches corticaux d'actine. Un anneau contractile d'actomyosine se forme et les septines se divisent en deux anneaux. L'ensemble se contracte sur la constriction pendant qu'une paroi rigide de chitine est réticulée (polymère composant la paroi cellulaire externe). Finalement les forces de croissance exercées de part et d'autre de la constriction achèvent la séparation des deux cellules. Notons que comme chez *S. cerevisiae*, la cellule-fille levure a une taille inférieure à la mère à sa naissance [79].

Les pseudo-hyphes se comportent de façon similaire aux levures mis à part trois points. Tout d'abord les protéines de polarité et de biogénèse de la paroi restent localisées plus longtemps entraînant la polarisation extensive de la cellule fille. Ensuite, les cellules semblent passer plus de temps en  $G_2$  par rapport aux levures. Finalement l'aspect le plus visible est que les deux cellules résultantes ne se séparent pas après la mitose : la septation est incomplète.

La cinétique de ces événements et la localisation des protéines orchestrant la croissance semble différer un peu plus chez les hyphes.

Tout d'abord, à l'émergence du bourgeon (ou *tube germinatif*), les septines se réorganisent rapidement sous forme de câbles situés à la jonction levure-hyphe. Ils restent parallèles à la direction de croissance. Un second groupe de septines se regroupe à l'extrémité du tube germinatif et forme une cape guidant la polarisation. Cette étape d'évagination s'accompagne aussi de la formation d'un complexe de polarité spécifique aux hyphes, le *Spitzenkörper*. Il se maintient tout au long du cycle, entretenant la polarité du trafic d'endocytose et d'exocytose (voir dans la partie 1.3.2) [79].

Durant ce qui s'apparente à sa phase  $G_1$ , le tube germinatif croît et forme un anneau de septines (préseptum) en aval de l'évagination. La cellule entre ensuite en phase  $G_2$  avec la duplication du *spindle pole body*. Contrairement aux levures et pseudo-hyphes la croissance reste polarisée et il n'y a pas de constriction au préseptum. Durant la mitose, les noyaux se séparent dans la cellule mère en amont du préseptum. Les câbles et les patches d'actine corticale restent concentrés près du site de croissance tout au long de ces phases.

Une fois que la mitose est complète et que le fuseau mitotique est entièrement séparé, Berman *et al.* ont observé une réorganisation du pré-septum avec la formation d'un mur de chitines entouré de part et d'autre par des anneaux de septines. Ils proposent que la formation de ce septum marque la fin du cycle de division cellulaire.

La cellule fille ainsi formée (alors appelée cellule *apicale*) semble entrer dans un nouveau cycle cellulaire extrêmement rapidement par rapport aux levures. En effet, les travaux de thèse d'Elodie Couttenier mettent en lumière la formation d'un nouvel anneau de septines en très peu de temps, moins de 10 minutes, suggérant une phase  $G_1$  beaucoup plus courte. A titre de comparaison la phase  $G_1$  des cellules filles durer jusqu'à 1 h chez *S. cerevisiae* [61].

Ces mêmes observations suggèrent que la séparation des noyaux ne coïncide pas avec la cyto-cinèse chez *C. albicans*, contrairement à *S. cerevisiae*. Il y a un délai entre la séparation des noyaux et la septation complète. Cette (dé)coordination entre cycle nucléaire et cycle cellulaire pourrait s'apparenter à celle de *S. pombe* [277]. Chez cette levure, la formation complète du septum a lieu après la mitose, durant une phase  $G_1$  elle aussi très courte, tandis que la séparation complète n'a lieu qu'après l'entrée en phase S (réplication d'ADN).

### Vacuoles et progression dans le cycle

Nous venons d'évoquer le déroulé du cycle cellulaire et nucléaire et comment ils sont orchestrés

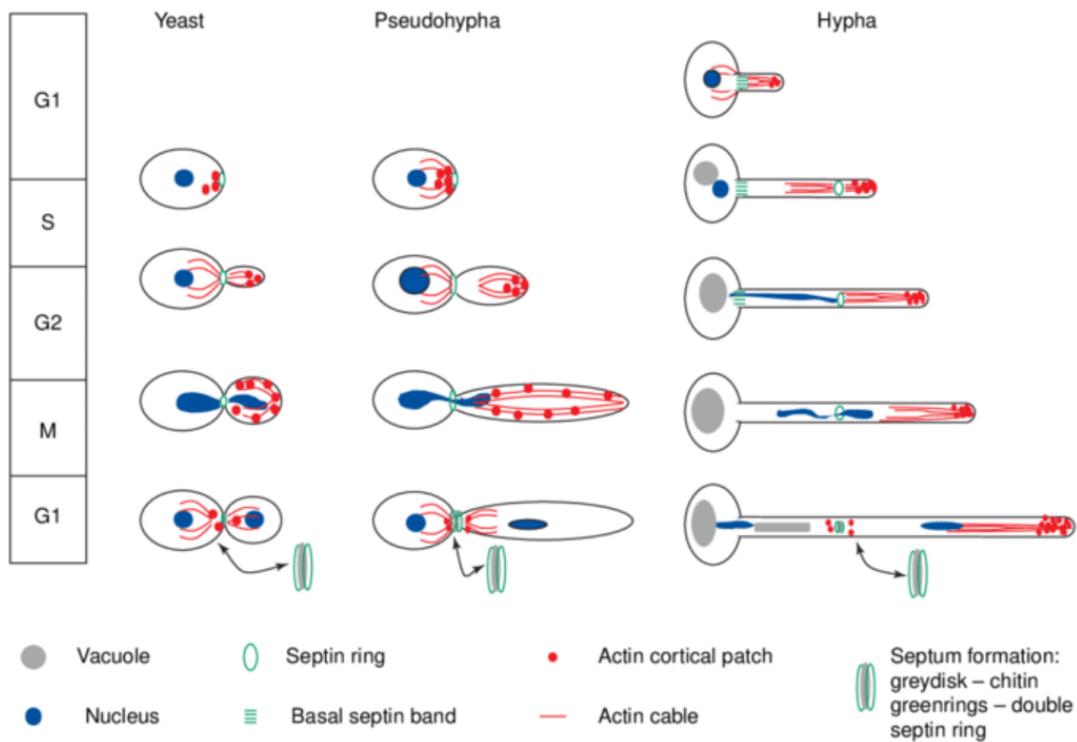


FIGURE 1.21 – Les différents évènements du cycle nucléaire et cellulaire chez la levure, le pseudo-hyphe et l'hyphe. Les noyaux et le complexe mitotique sont présentés en bleu, l'actine en rouge, les septines en vert [272].

par différentes protéines. Chez les hyphes, ces observations sont faites dans le cas des cellules apicales, qui semblent donc réentrer dans le cycle cellulaire très rapidement.

Veses *et al.* ont observé que les cellules subapicales des hyphes réentrent dans le cycle et forment un bourgeon ou un branchement après un laps de temps plus important, équivalent à plusieurs cycles cellulaires (Fig. 1.22-A). Cette durée supplémentaire correspond à un arrêt en phase  $G_1$ . Ce phénomène d'asymétrie entre la division apicale et subapicale peut être relié à la coordination croissance-division. En effet, selon le modèle de progression du cycle proposé par la littérature, chaque cellule doit atteindre une taille critique avant de poursuivre son cycle (ici en  $G_1$ ).

Veses *et al.* proposent que c'est en réalité le volume de cytosol qui doit être plus spécifiquement considéré. En effet, la cellule apicale hérite de la plupart du volume cytosolique durant la cytoténèse, tandis que le cytoplasme de la cellule subapicale (mère) se retrouve principalement occupé par des vacuoles<sup>7</sup> (Fig. 1.22-D). Ils suggèrent que la cellule mère doit donc synthétiser plus de biomasse jusqu'à retrouver un volume critique de cytosol (volume effectif) pour pouvoir entrer en phase S et produire un branchement (Fig. 1.22-B). L'asymétrie du mode de croissance serait donc ici renversée par rapport à la prolifération par bourgeonnement connue chez *S. cerevisiae* [284].

En affectant les voies de régulation des vacuoles Barelle *et al.* ont observé que les hyphes contenant un volume vacuolaire plus important dans leurs compartiments produisent peu de

7. Les vacuoles sont de larges organelles spécifiques aux organismes fongiques et aux plantes. Elles participent au maintien de l'homéostasie de la cellule. Elles sont délimitées par une membrane lipidique qui entoure une poche aqueuse riche en enzymes. Ses principales fonctions sont l'adaptation du pH cytoplasmique, le stockage et la dégradation de protéines et autres déchets, le maintien de l'osmolarité.

branchements et ont un volume total plus important [21]. A l'inverse les cellules subapicales qui contiennent moins de vacuoles forment plus rapidement des branchements réduisant ce phénomène d'asymétrie. Ce mécanisme pourrait participer à la virulence et à l'invasion mécanique en soutenant la croissance au niveau de la cellule apicale, permettant peut-être ainsi de maximiser la distance explorée par rapport au matériel (biomasse) disponible dans l'ensemble de l'hyphe. Une autre observation irait en ce sens : la fréquence de branchement des hyphes dépend de la concentration et du type de nutriments disponible. Elle augmente par exemple avec le pourcentage de sérum en milieu liquide et diminue dans un milieu pauvre en nutriments [19] (Fig. 1.22-C).

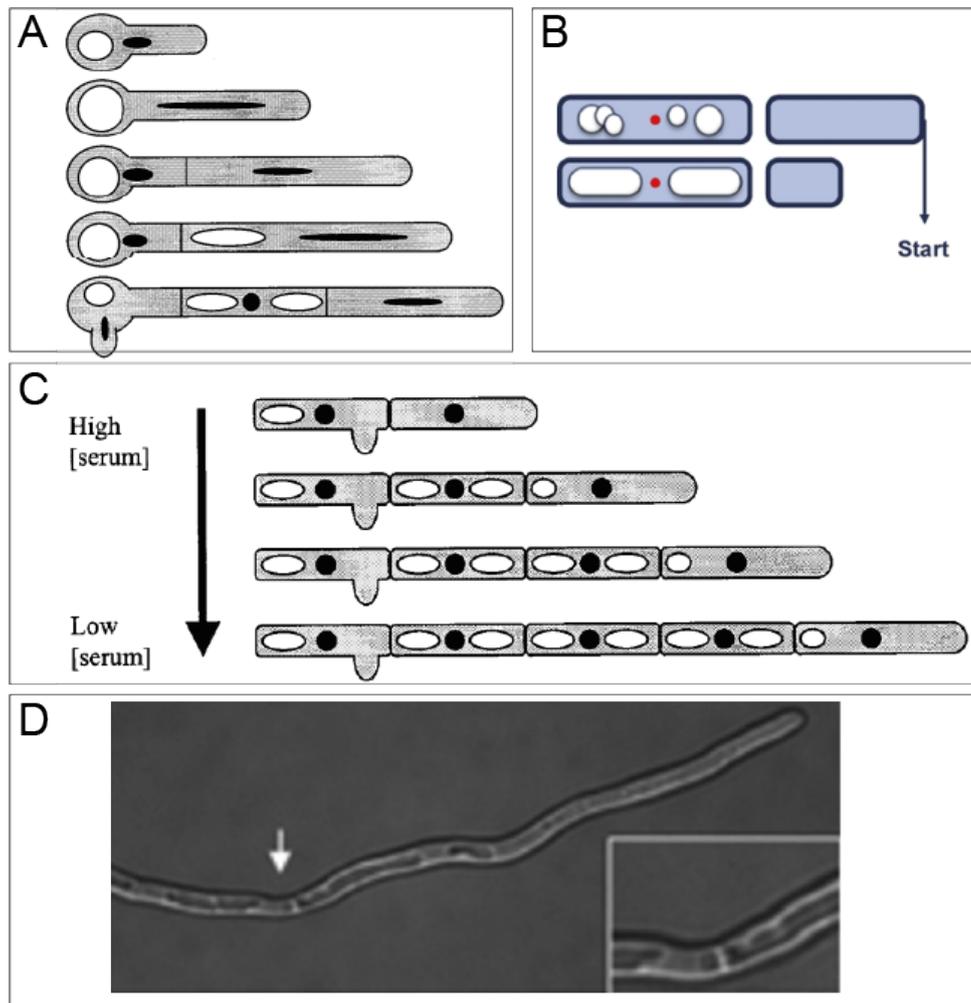


FIGURE 1.22 – (A) Modèle de division cellulaire asymétrique entraînant une désynchronisation des cellules subapicales. Barelle, Veses *et al.* proposent que cette asynchronie trouve son origine dans la distribution du volume de vacuoles transmis à la cellule apicale à chaque septation [19]. (B) Influence de la redistribution des vacuoles durant la progression du cycle. La proportion du volume de cytosol, et non seulement le volume total de la cellule, influence le délai de réentrée en phase S du cycle [284]. (C) Relation entre la concentration en sérum et le délai de réentrée dans le cycle des cellules subapicales observée par Barelle *et al.* [19]. (D) Les cellules subapicales contiennent plus de vacuoles. La flèche marque un septum séparant deux cellules subapicales [283].

Lien entre morphogénèse et progression dans le cycle?

Plusieurs études ont observé que des levures *C. albicans* en phase stationnaire rediluées en milieu stérile sont plus sensibles aux stimuli favorisant la filamentation. Une partie de l'explication pourrait être reliée au rinçage du *quorum-sensing* (voir dans la partie 1.2.5). Il est aussi possible que la réentrée dans le cycle depuis la phase stationnaire (quiescence) soit un facteur suffisant pour permettre la filamentation. Ces expériences ouvrent des nouvelles interrogations : est-ce que la morphogénèse peut se produire à n'importe quel stade du cycle cellulaire ?

Les observations de Soll *et al.* [266] suggèrent que la morphogénèse correspond à une réentrée dans le cycle. Ils ont observé la dynamique de réentrée dans le cycle de cellules inoculées à 37°C dans du milieu nutritif après une période de déprivation en nutriments.

Les cellules qui présentent des bourgeons de petite taille poursuivent leur cycle en formant un hyphe. En revanche les cellules ayant déjà un bourgeon relativement large terminent leur cycle cellulaire avant de former un hyphe. Les auteurs suggèrent que le point critique à partir duquel la morphogénèse n'est plus possible correspond à la transition de la croissance polarisée à la croissance isotropique du bourgeon. Cette transition se déroule au passage de la phase S à la phase  $G_2$ , ouvrant là encore une forme de fenêtre temporelle d'opportunité à la morphogénèse. Une vue schématique de ces observations est présentée figure 1.23 [266].

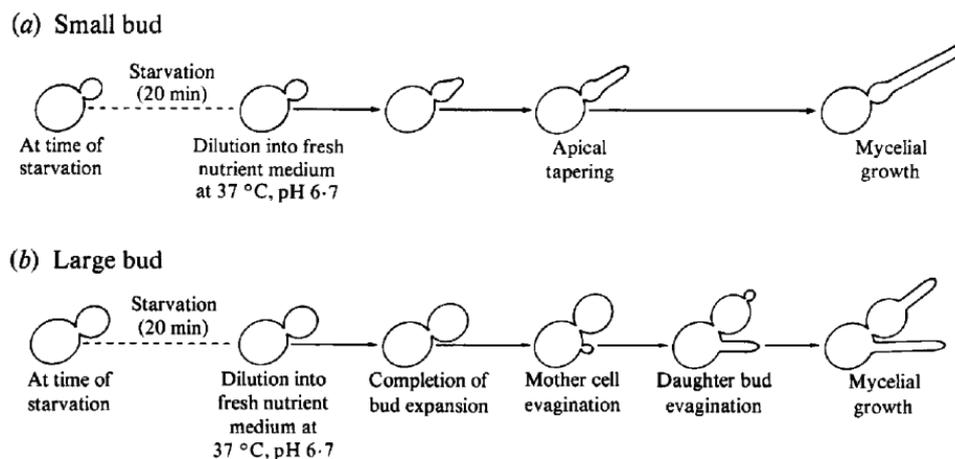


FIGURE 1.23 – Schéma des deux modes d'évagination et d'engagement dans la morphogénèse selon le stage du cycle durant lequel la cellule est soumise au stimulus inductif (ici, reprise de la croissance à 37°C après déprivation de nutriments pendant 20 min) [266].

Les travaux de Liu *et al.* [116] suggèrent au contraire que la croissance hyphale peut débuter depuis n'importe quelle phase du cycle. Pour cela ils ont inoculé des cellules en phase de croissance exponentielle dans du milieu liquide contenant 10% de sérum à 37°C. Dans leur cas, même les cellules ayant un large bourgeon ont été capables de former ce qui s'apparente à un hyphe. L'observation de l'état du *spindle pole body* a confirmé que les cellules formant ces évaginations sont bien en phase  $G_1$ , S/ $G_2$  ou M. Cependant, plus l'émergence de l'hyphe est tardive dans le cycle, plus son aspect morphologique s'éloigne d'un hyphe et se rapproche d'un pseudo-hyphe (largeur plus importante, présence de constriction entre cellule mère et fille). En comparaison, des cellules synchronisées en  $G_1$  par élutriation présentent une distance médiane de 15  $\mu\text{m}$  entre le septum et le site d'évagination (voir Figure 1.24), ce qui correspond à la morphologie hyphale selon les critères proposés par Sudbery, Soll *et al.* [272] (voir partie 1.1.2).

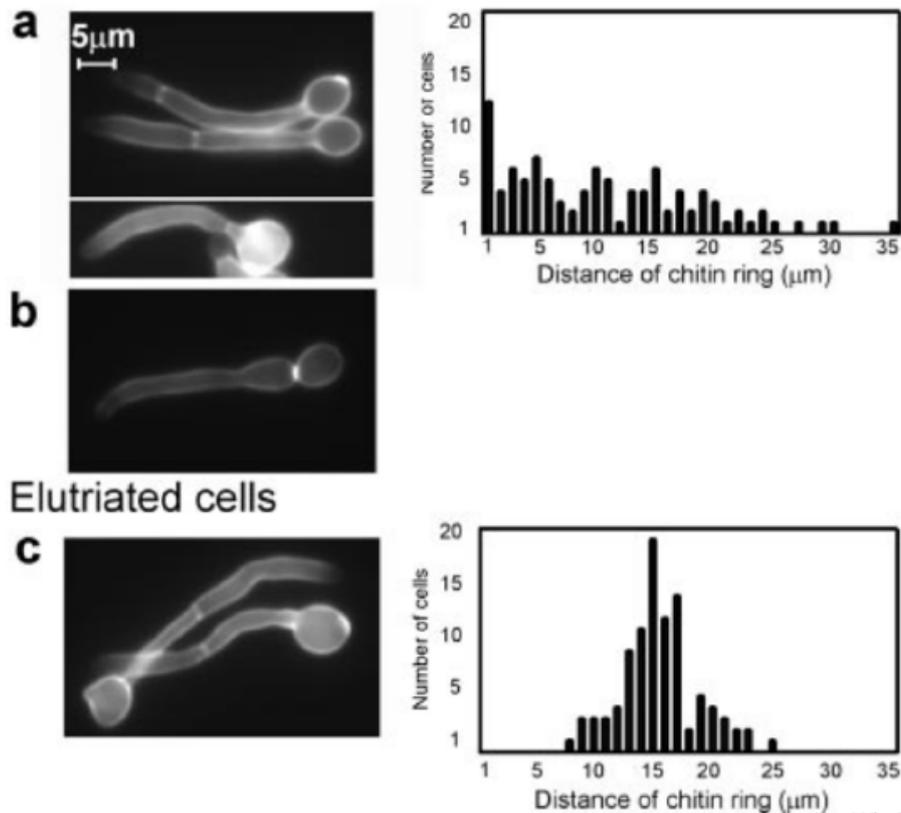


FIGURE 1.24 – Morphologies de cellules après 3 h sous stress inductif (YPD, 10% sérum à 37°C) à partir de différents stades du cycle cellulaire. **A gauche** : la paroi cellulaire et les septa en chitine (flèches) sont visibles en fluorescence. **A droite** : distributions des distances entre le premier septum et la base de l’hyphé (évacuation) d’un échantillon de cellules non-synchronisées dans une phase du cycle (**a-b**) ; ou synchronisées en  $G_1$  (**c**) [116].

### 1.3.2 Mécanismes de croissance des hyphes

#### La pression de turgescence, moteur de la croissance

La pression de turgescence existe chez tous les types cellulaires. Elle atteint des valeurs importantes chez les organismes pourvus d’une paroi cellulaire rigide comme les plantes ou les levures. Cette pression a pour origine la différence de pression osmotique entre l’intérieur de la cellule et son environnement. En effet, la paroi cellulaire est perméable à l’eau et permet sa diffusion. Nous allons d’abord définir la pression osmotique.

Prenons deux réservoirs, A et B, séparés par une membrane perméable à l’eau. Si le réservoir A contient un soluté en plus grande concentration que B, alors le potentiel chimique  $\Pi$  va passivement s’équilibrer par la diffusion d’eau de B vers A. La pression hydrostatique s’établit ainsi lorsque l’équilibre des potentiels chimiques de part et d’autre est atteint. Cet équilibre peut être écrit à partir de la loi de Van’t Hoff comme suit :

$$\Delta\Pi = \Pi_A - \Pi_B = RT(n_A - n_B)/V = RT\Delta C$$

L’eau applique donc constamment une pression hydrostatique sur des membranes perméables. La pression de turgescence  $P_t$  est définie comme la différence entre la pression osmotique intra-

cellulaire  $\Pi_i$  et la pression osmotique extra-cellulaire  $\Pi_e$  à volume constant :

$$P_t = \Pi_i - \Pi_e = \Delta\Pi$$

Comme les cellules sont très concentrées en solutés, la pression hydrostatique s'exerce vers l'extérieur de la membrane qui les entoure (cas hypotonique) :

$$\Pi_i \gg \Pi_e \Rightarrow P_t \gg 0$$

C'est ici que la paroi cellulaire rigide entre en jeu et maintient l'intégrité de la cellule. Sa résistance élastique équilibre la pression hydrostatique. La tension de la paroi à l'équilibre peut être écrite sous la forme d'une pression  $P_r$ , comme le ratio entre la tension surfacique de la paroi sur le rayon de courbure [102]. A volume cellulaire constant, par exemple en phase stationnaire, cet état d'équilibre des forces s'exprime par l'égalité :

$$P_r = \Delta\Pi = P_t$$

Dans le cas de cellules sans paroi rigide, l'apport d'eau entraîne un gonflement extensif qui peut mener à la lyse. Les cellules animales sont uniquement entourées d'une membrane plasmique qui, avec le cortex d'actine, permet d'équilibrer les pressions hydrostatiques. Elles sont donc plus sensibles à la variation d'osmolarité de l'environnement car celle-ci est peu résistante.

Lorsque ce point d'équilibre est modifié par l'ajout de solutés dans l'environnement de la cellule, cela entraîne un choc *hyper-osmotique*. De l'eau sort de la cellule et la pression hydrostatique décroît, entraînant une diminution du volume cellulaire. A l'inverse, si la concentration du milieu diminue cela engendre un choc *hypo-osmotique*, l'eau entre dans la cellule et provoque l'extension supplémentaire de la paroi.

Les levures sont capables de s'adapter aux chocs hyper-osmotiques par l'influx d'ions. Dans le cas de solutés imperméables à la membrane cellulaire (sorbitol), les cellules répondent en synthétisant des osmolytes (principalement du glycérol) afin de revenir à leur point d'équilibre (turgescence). En cas de choc hypo-osmotique, la tension supplémentaire qui s'exerce sur la paroi entraîne l'ouverture de pores membranaires composés d'aquaporines favorisant l'évacuation d'eau tout en faisant barrière aux solutés [165].

La pression de turgescence maintient la forme de la cellule, c'est aussi un moteur de la croissance. Plusieurs études ont montré que la pression de turgescence module la vitesse d'extension des hyphes. Par exemple Lew *et al.* ont imposé un choc hyper-osmotique à un hyphe de *Neurospora crassa*. Pour cela, ils ont injecté des gouttes d'huile siliconée avec une micropipette directement dans le cytoplasme de l'hyphe. Après un délai durant lequel l'élongation s'arrête, l'hyphe accroît sa pression de turgescence puis reprend sa croissance à la vitesse initiale [166].

La pression de turgescence est une force isotrope par nature. Pourtant la croissance est extrêmement polarisée chez les hyphes mais aussi lors de l'émergence des bourgeons de levures comme nous l'avons évoqué dans la partie 1.3.1. Pour que l'extension de la paroi cellulaire soit effectivement dirigée selon une direction particulière, la cellule met en jeu différents mécanismes que nous allons décrire dans les paragraphes suivants.

### Biogénèse de la paroi cellulaire

L'extension polarisée d'une cellule implique la variation des propriétés mécaniques de sa paroi pour permettre localement des déformations plastiques. Ce processus requiert de nombreuses

protéines qui contrôle le site de sélection de la croissance, la ré-organisation du cyto-squelette d'actine, et la polarisation du système de sécrétion.

Chez l'hyphe, cette extension exclusivement apicale requiert à la fois une plasticité importante de la paroi à l'apex du filament et des parois latérales ayant une résistance élastique suffisante pour maintenir la morphologie malgré la pression de turgescence [299].

La paroi cellulaire comporte deux parties : la membrane composée d'une bicouche lipidique entourée d'une seconde paroi plus rigide. La paroi de *C. albicans* se compose de plusieurs strates de polymères. La couche interne comporte un réseau dense de polysaccharides ( $\beta$ -glucanes et chitine principalement), elle est entourée par une seconde couche de mannoprotéines qui composent la face externe (voir Figure 1.25-A) [55].

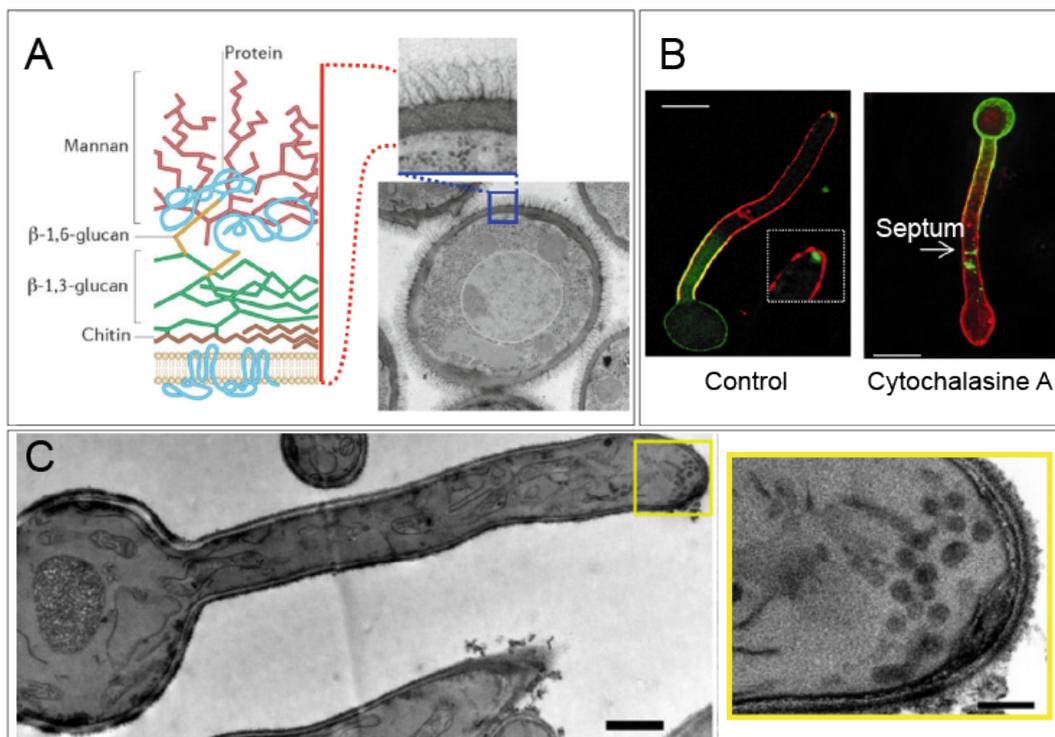


FIGURE 1.25 – (A) Composition de la paroi cellulaire schématisée, et vue en microscopie électronique [55]. (B) La perturbation de la polymérisation du cytosquelette d'actine entraîne le "gonflement" de la cellule apicale d'un hyphe durant sa croissance (à droite). La paroi cellulaire avant l'addition du traitement inhibant la polymérisation d'actine (Cytochalasine A) apparaît en vert, et en rouge après. La protéine Mlc1 composant le complexe de polarisation spécifique à l'hyphe (encart à gauche) *Spitzenkörper* est également délocalisée au septum par le traitement (flèche). Barre d'échelle 5  $\mu$ m [62]. (C) Vue en microscopie électronique de l'accumulation des vésicules à l'extrémité de d'un hyphe chez *C. albicans*. Le diamètre moyen de ces vésicules est de 70  $\mu$ m. Barres d'échelles : 100  $\mu$ m , encart 200 nm [298].

L'expansion apicale de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire est entretenue par l'apport régulier de nouveau matériel, protéines et lipides. Le Golgi assure l'acheminement régulier de ce matériel en produisant des vésicules d'exocytose. Ces vésicules cargos véhiculent les protéines de synthèse de la membrane produites par le réticulum endoplasmique jusqu'au site de croissance.

Chez *C. albicans*, ces vésicules circulent ensuite le long de câbles d'actine (voir Figure 1.26-b)

qui sont polymérisés selon l'axe longitudinal de l'hyphe sous le contrôle de la *Small GTPase* Cdc42. Ils sont ainsi tractés le long de l'hyphe par des moteurs de myosines, dont la cinétique est régulée par le complexe Myo1/Mlc1.

Les cellules qui composent l'hyphe sont deux à quatre fois plus allongées (10-20  $\mu\text{m}$ ) que la morphologie levure (5  $\mu\text{m}$ ). Ainsi, le matériel nécessaire à la biogénèse doit être délivré rapidement sur des distances relativement grandes. Les observations de Weiner *et al.* suggèrent que le réticulum endoplasmique<sup>8</sup> et le Golgi migrent le long du tube germinatif durant sa croissance.

Ce repositionnement des organites sécrétoires permet de diminuer la distance de parcours des vésicules sur l'actine et augmenterait la cinétique de croissance [299]. La formine<sup>9</sup> Bni1 assure la polarisation du Golgi et son repositionnement près de l'extrémité, ce qui minimise la distance que les vésicules ont à parcourir.

De plus, contrairement à d'autres pathogènes filamenteux, les hyphes de *C. albicans* présentent un réseau d'actine typiquement concentré à la partie apicale [46, 299]. Le cytosquelette d'actine est donc un acteur majeur durant la croissance polarisée, assurant la redirection des sécrétions. Lorsqu'il est perturbé, l'hyphe perd rapidement sa polarisation et poursuit temporairement sa croissance de manière isotrope (voir Figure 1.25-B) [62].

Parvenues près de l'extrémité de l'hyphe, les vésicules s'accumulent et forment un amas, le *Spitzenkörper* (voir Figure 1.25-C), nous y reviendrons dans le paragraphe suivant. Elles transitent ensuite le long de filaments d'actine dont la nucléation apicale est activée par la formine Bni1.

La dynamique d'exocytose (incorporation des vésicules à la membrane) est contrôlée par plusieurs complexes de polarité qui forment une structure stable à la membrane : le polarisome. Les vésicules s'attachent à la membrane plasmique grâce à différents complexes protéiques (exocyste et famille Sec/Exo) pour y délivrer leurs composants [78, 138]. Les liaisons moléculaires des polymères de la paroi sont d'abord déconstruites par des enzymes hydrolytiques telles que les chitinases et les glucanases [219, 290]. Suite à cette déformation plastique, de nouvelles enzymes du polarisome assurent l'incorporation des blocs depuis le cytoplasme et leur réticulation [219, 78].

L'expansion rapide de l'hyphe est contrebalancée par une dynamique d'endocytose particulièrement active. L'endocytose permet à la cellule de recycler les éléments de la membrane (lipides, protéines) afin de polymériser de nouveaux blocs. Les complexes de polymérisation de l'actine comme Myo5 sont ici particulièrement impliqués [11]. Si l'exocytose se situe à la membrane apicale, le site d'endocytose forme lui un anneau quelques micromètres en amont (voir Figure 1.26-e).

Le principal régulateur des complexes de polarité est une GTPase de type Rho, Cdc42. L'activité de cette protéine est essentielle à l'extension de l'hyphe. La localisation de sa forme active GTP-liée guide à la fois à l'exocytose et l'endocytose mais aussi l'activité de formines (polymérisation d'actine) et l'influx de calcium  $Ca^{2+}$  (thigmotropisme, voir partie 1.3.2) ainsi que la séparation des cellules [11].

Le complexe comportant la cycline Hgc1 (cycline de  $G_1$  spécifique des hyphes) promeut la localisation de Cdc42 à l'extrémité pour assurer la polarité. Ce complexe inhibe également la septation complète chez les hyphes en désactivant les enzymes responsables de la dégradation du septum après la cytokinèse [62].

8. Organite dans lequel sont synthétisées les protéines destinées aux vésicules d'exocytose.

9. Les formines sont une classe de protéines qui régulent les sites de nucléation (initiation de la polymérisation) de l'actine.

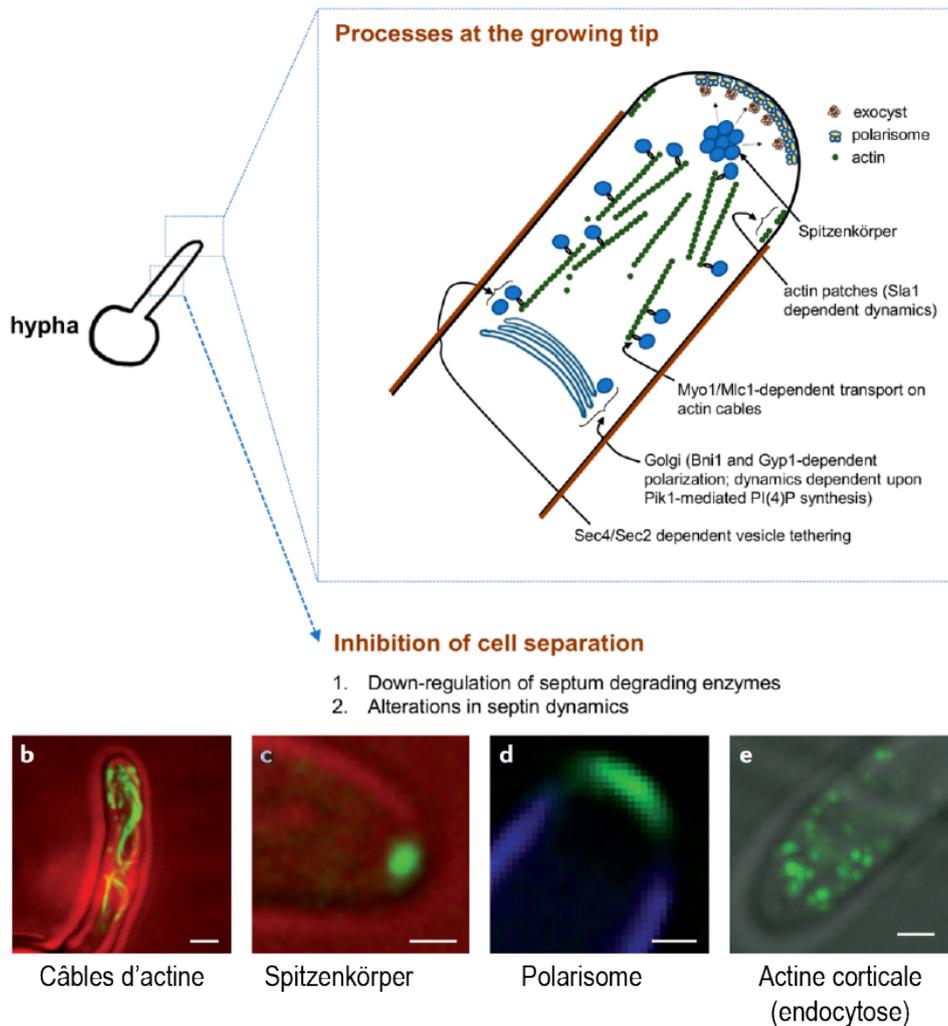


FIGURE 1.26 – (a) Schéma des principaux processus et protéines impliqués dans la croissance polarisée de l'hyphe. Le Golgi est repositionné dans la région sub-apicale puis polarisé en direction du site de croissance via Bni1 notamment. Les protéines Sec2/Sec4 participent au transport et à l'attachement des vésicules aux câbles d'actines. Ils sont ensuite acheminés le long des câbles d'actine grâce aux moteurs de myosine (Moy2/Mlc1). Ils forment un amas à l'extrémité, le *Spitzenkörper* depuis lequel ils sont redistribués. Le polarisome active la polarisation de filaments d'actine le long desquels les vésicules achèvent leur parcours jusqu'à la membrane. Le long du polarisome, des complexes contrôlés par la GPTase Cdc42 ancrent ces vésicules à la membrane durant l'exocytose, et les vésicules fusionnent à la membrane. En parallèle les patches d'actine corticale sont recrutés dans la région sub-apicale par Sla1 et participent à l'endocytose de la membrane ce qui permet d'en recycler les éléments. Enfin, la séparation cellulaire est réprimée en inactivant les enzymes dégradant le septum, et par la modulation des septines. Différents éléments participant à la croissance apicale vus en fluorescence : (b) câbles d'actine en GFP; (c) protéine véhiculant les vésicules d'exocytose (Sec4) couplée à la GFP accumulée au *Spitzenkörper*; (d) protéine Exo70 couplée à la GFP stabilisée à la membrane sur le site du polarisome; (e) Abp1 colocalise avec les patches d'actine corticale (sites d'endocytose) [78].

### Complexes de polarité

Dans ce paragraphe, nous allons plus spécifiquement présenter les complexes de polarité qui maintiennent la synthèse localisée du mur.

Tout d'abord, le polarisome forme un centre stable localisé à la membrane apicale et qui organise les sites de nucléation de l'actine sous la régulation de Cdc42. Cette structure cytoplasmique en forme d'arc comporte des protéines promotrices de nucléation comme Bud6, la formine Bni1, la protéine structurante Spa2, et Mlc1. La localisation, la taille et la densité de cet ensemble de protéines varie durant le cycle cellulaire. Chez la levure et le pseudo-hyphe, le polarisome se disperse progressivement durant la phase  $G_2$ , entraînant le passage d'un mode de croissance apical à la croissance isotropique du bourgeon. Finalement, il se dissout durant la mitose et Mlc1 se relocalise alors à la constriction mère-fille pour former l'anneau contractile qui permet la septation après cytokinèse [138, 311]. Chez l'hyphe, le polarisome forme une structure en forme de croissant au niveau de la membrane apicale qui reste stable tout au long du cycle (voir Figure 1.26- d).

D'autre part, chez l'hyphe, les vésicules sécrétoires s'accumulent légèrement en amont de l'extrémité (moins d'un micromètre). Ils y forment un amas dont la population, sans cesse renouvelée, se stabilise autour de la soixantaine [299] (voir Figure 1.26-c). Cette structure spécifique aux hyphes, le *Spitzenkörper* ("corps apical"), constitue un point de transit des vésicules orchestré par Bni1 et Mlc1. La maintenance du *Spitzenkörper* requiert des éléments du polarisome, mais aussi l'intégrité des filaments d'actine [138, 289, 62]. Contrairement au polarisome, le *Spitzenkörper* reste présent tout au long du cycle, même durant la mitose où Mlc1 est alors à la fois localisée au *Spitzenkörper* et au site de septation.

Arkowitz *et al.* proposent que cette structure agît comme un centre de redistribution dynamique des vésicules sur de courtes distances [11, 138]. Wright *et al.* ont utilisé une pince optique pour contrôler spatialement le *Spitzenkörper*. Ils ont observé que sa position est corrélée à la direction de croissance de l'hyphe et semble la moduler [308].

## Thigmotropisme

Les hyphes présentent une autre caractéristique qui les différencie des levures et pseudo-hyphes : le thigmotropisme. Cette propriété serait également impliquée durant l'invasion mécanique. Il s'agit de la capacité à détecter des contours de surfaces et à réorienter la croissance en réponse à ce contact physique. Un phénomène similaire, la thigmonastie, c'est-à-dire réaction au contact a déjà été observé chez les plantes. Chez certaines plantes notamment carnivores (*Dionaea muscipula*, dit "attrape mouches") ou la "sensitive" *Mimosa pudica*, il est même spectaculaire (voir Figure 1.27) [36].

Chez *C. albicans*, les hyphes sont capables de détecter des variations topographiques submicrométriques [37]. Ce comportement est visible au travers de plusieurs phénomènes (voir Figure 1.28-A). Premièrement au contact d'une surface rigide, les hyphes semblent croître en maintenant leur extrémité contre la surface dans une morphologie dite, "nose-down" (Fig. 1.28-B). Ce comportement augmente la surface de contact et semble dépendre de la rigidité de la paroi extracellulaire rencontrée. Un hyphe placé au contact simultané de deux parois oriente son extrémité contre le substrat le moins rigide. Les auteurs suggèrent aussi que la réponse thigmotropique nécessite des forces de friction (adhérence) entre l'hyphe et le substrat [274].

Brand *et al.* proposent que la réorientation de la croissance en réponse au contact passe par l'influx de calcium. Le contact contre une surface rigide entraîne une extension locale de la paroi, augmentant la tension de surface. Ces forces mécaniques à la paroi sont détectées via des canaux ioniques mécanosensibles formés par la protéine Mid1. L'ouverture de ces canaux active en réponse la voie de signalisation de la calcineurine. Elle favorise l'apport de calcium  $Ca^{2+}$  qui se concentre au site d'extension (voir Figure 1.28-D). Des mutants de cette voie se réorientent significativement moins que la souche sauvage. En effet, les gradients de concentration en calcium font

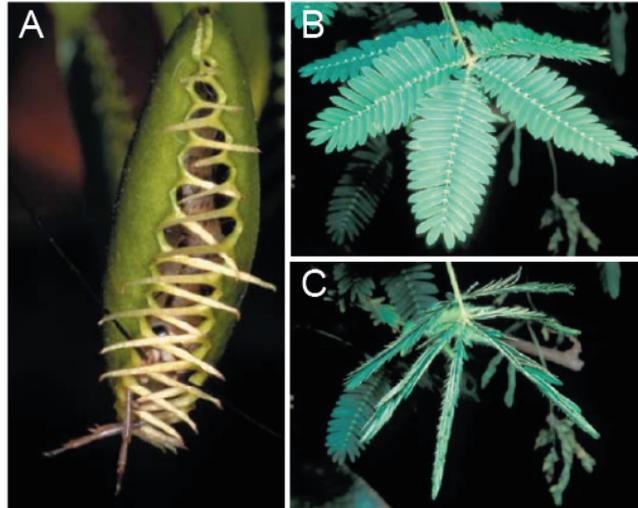


FIGURE 1.27 – Exemple de thigmonastie, sensibilité au touché chez les plantes : (A) Un insecte piégé entre les feuilles de la plante carnivore *Dionaea muscipula* et la plante *Mimosa pudica* avant (B), et après (C) avoir été effleurée [36].

partie des mécanismes supportant la croissance polarisée [37]. De plus, les hyphes se réorientent lorsqu'un champ électrique est appliqué au milieu environnant (galvanotropisme) via le canal ionique Cch1. Cela souligne l'importance des influx ioniques dans l'orientation de la croissance hyphale [38].

Thomson *et al.* ont aussi observé que lorsqu'un hyphe arrive perpendiculairement en face d'une paroi, la position de Mlc1 oscille avant de prendre une nouvelle direction (Fig. 1.28-C) [274]. Le comportement de cette protéine, colocalisée au *Spitzenkörper*, suggère que cette structure participe à la réponse thigmotropique.

## 1.4 Liens entre croissance et contraintes mécaniques chez les levures

Les cellules prolifèrent en augmentant leur volume et en se divisant, et nous avons vu que ces mécanismes sont reliés à la biosynthèse de la paroi et à son expansion. Contrairement aux cellules animales, les levures possèdent une paroi cellulaire rigide. Cette paroi cellulaire leur permet de développer des forces cent à mille fois supérieures, par l'intermédiaire de la pression de turgescence. Cette paroi rigide maintient aussi l'intégrité cellulaire en contrebalançant les forces mécaniques exercées par l'environnement extracellulaire. Durant leur cycle de vie, les cellules détectent et répondent à ces forces qui s'exercent sur la paroi en modulant sa biosynthèse et la polarité de la croissance [197].

Nous venons d'illustrer sommairement les mécanismes qui orchestrent la croissance polarisée chez *C. albicans* et plus spécifiquement chez l'hyphe. Plusieurs propriétés des hyphes, dont le thigmotropisme, semblent indiquer qu'ils sont sensibles à des contraintes mécaniques.

Nous allons maintenant décrire dans cette partie comment la croissance des cellules développe des forces mécaniques sur leur environnement, quel est l'effet rétroactif de ces forces sur la croissance, et comment elles sont détectées par les cellules. Pour cela, nous nous appuierons sur les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, deux organismes modèles particulièrement documentés.

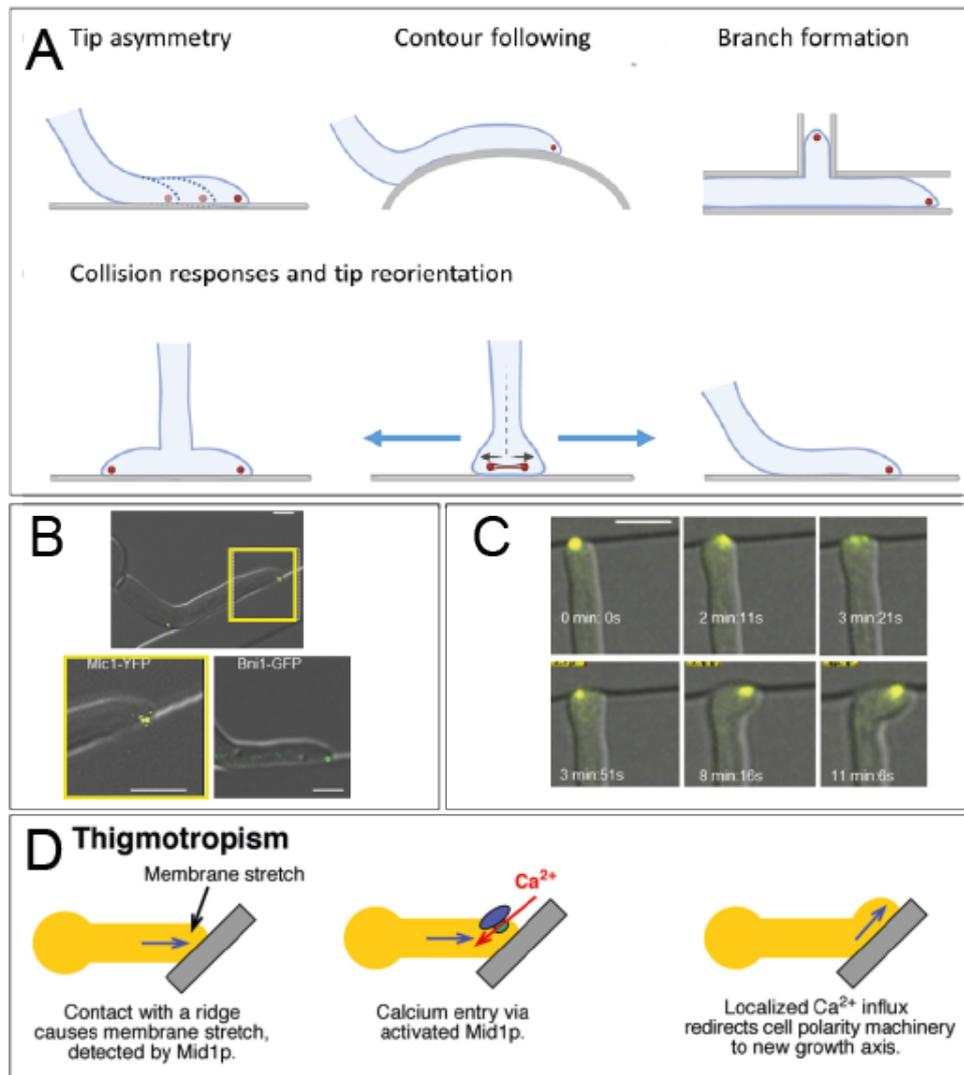


FIGURE 1.28 – (A) Schéma résumant différentes réponses des hyphes au contact physique avec des topographies [28]. (B) Le contact apical de l’hyphe entraîne une asymétrie et le repositionnement des complexes de polarité contre le substrat. Le *Spitzenkörper* est ici indiqué par le marquage en fluorescence de *Mic1* et *Bni1*. Barre d’échelle 2  $\mu$ m [274]. (C) Lorsqu’un hyphe rencontre un obstacle perpendiculaire à sa direction de croissance, le *Spitzenkörper* (ici marqué par *Bni1*) oscille pendant un laps de temps avant de se réorienter. Cette asymétrie dirige la croissance polarisée dans une nouvelle direction le long de la barrière. Barre d’échelle : 5  $\mu$ m [274]. (D) Le modèle de réponse thigmotropique via la protéine *Mid1* et l’augmentation locale de la concentration en calcium [37].

Nous discuterons ensuite les voies mécanosensibles conservées chez *C. albicans*, et des contextes potentiels dans lesquels les forces mécaniques impactent sa morphogénèse et sa virulence.

### Les cellules en croissance développent des forces sur leur environnement

Les microbes qui composent le microbiote prolifèrent dans un environnement complexe et encombré. Lorsque l’espace disponible est restreint par le micro-environnement, plusieurs études ont remarqué que la croissance des cellules développe des forces mécaniques. Ces phénomènes

sont activement étudiés dans le cadre des tumeurs cancéreuses qui engendrent des forces compressives en se développant dans la matrice extra-cellulaire [132, 293].

Nous allons ici donner quelques exemples qui mettent en lumière l'existence de telles forces induites par la croissance chez les levures. Deux observations permettent de déduire indirectement l'existence de ces forces : les déformations induites sur le micro-environnement et les cellules elles-mêmes, et la relaxation suite à la suppression du confinement spatial.

Un premier phénomène est visible à l'échelle macroscopique dans le cas des biofilms microbiens. Il consiste en la formation de "ridules" (ou "*wrinkles*" en anglais) chez certaines colonies proliférant sur des surfaces semi-solides comme les géloses d'agar. Principalement documentés chez les bactéries [101, 89], ces repliements macroscopiques sont interprétés comme résultants de forces compressives au sein de la colonie. Ces biofilms ne sont pourtant pas confinés spatialement à l'échelle macroscopique, mais ont des propriétés viscoélastiques. Les forces de friction engendrées et les forces de contact (adhérence), augmentent avec la biomasse du biofilm. Les cellules au centre repoussent celles en périphérie induisant des forces latérales provoquant leur réarrangement spatial. Ces interactions finissent par générer des hétérogénéités de rigidité induisant des sites de flambage au sein du biofilm (voir Figure 1.29-A) [143]. La délétion du gène *FLO11* chez *S. cerevisiae* perturbe l'adhérence entre cellules et les colonies de mutants *flo11Δ* ne forment pas ces repliements (voir Figure 1.29-B).

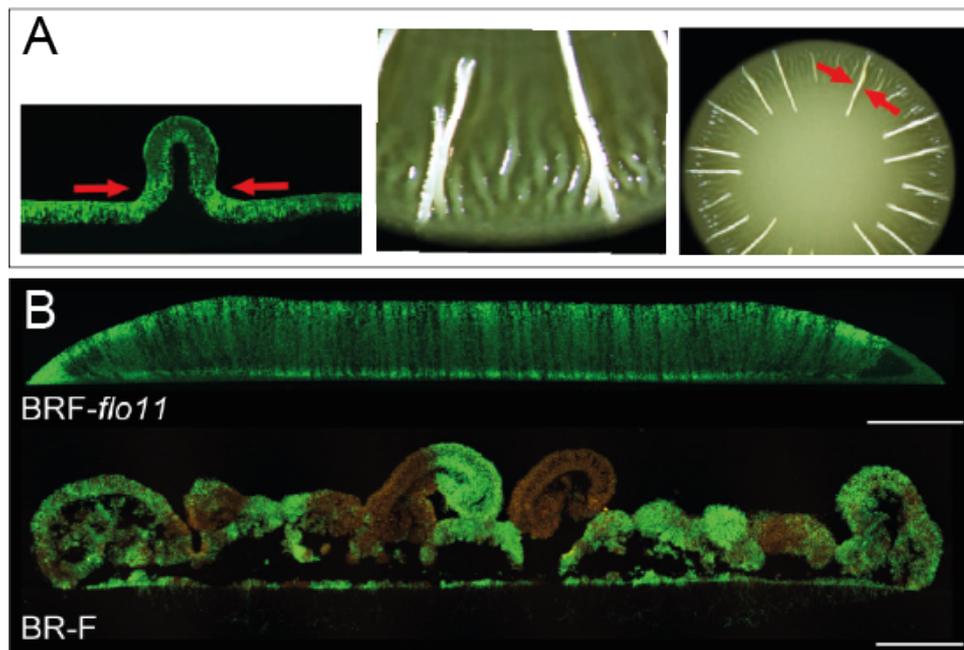


FIGURE 1.29 – (A) Une colonie de bactéries *E. coli* cultivée sur gélose d'agar pendant 2 jours forme des ridules et des plis. Les flèches rouges indiquent la direction des forces mécaniques générées [256]. (B) Vue en coupe de colonies *S. cerevisiae* : le mutant de *FLO11* (en haut) ne forme pas de ridule contrairement au contrôle (en bas). Barre d'échelle : 500  $\mu\text{m}$  [230].

La surexpression des gènes codant pour les protéines du mur de la famille *FLO* chez *S. cerevisiae* provoque la floculation de la culture. Ces mutants sont légèrement polarisés, leur septation reste incomplète, et les cellules sont plus adhérentes entre elles. En milieu liquide, ces souches forment alors des agrégats multicellulaires appelés "*flocons*". Dans leur étude, Jacobeen *et al.* ont observé que ces agrégats se fracturent lorsqu'ils atteignent un volume critique, suggérant le dé-

veloppement de forces entre les chaînes de cellules qui le composent. De manière intéressante, les phénotypes de cellules les plus allongés produisent les "flocons" plus volumineux, comportant plus de cellules. Les auteurs ont observé que les phénotypes polarisés favorisent la diminution de la fraction volumique de cellules dans le cluster. Ils suggèrent que ce phénomène ralentit le développement de chaînes de forces au centre du cluster et la survenue de la fracture (voir Figure 1.30) [131].

Le développement de chaînes de forces chez *S. cerevisiae* est aussi observé dans le cas de la croissance confinée spatialement. Delarue *et al.* ont utilisé des chambres microfluidiques déformables (parois de polydiméthylsiloxane, "PDMS") pourvues de valves passives en sortie. Les cellules y prolifèrent et remplissent le volume disponible. Les forces de contact entre cellules augmentent alors progressivement avec la densité de la population qui se comporte comme un milieu granulaire. La population développe collectivement une pression induite par sa croissance allant jusqu'à  $\sim 1$  MPa, qui déforme l'environnement élastique (Fig. 1.30-C, à gauche).

Durant ce processus, les cellules se déforment également les unes contre les autres (Fig. 1.30-B) et engendrent des chaînes de forces. Elles retiennent la population dans la cavité et permettent le développement de la pression "collective" (Fig. 1.30-C). Lorsqu'un évènement comme la mort d'une cellule ou son bourgeonnement vient les déstabiliser, une partie de la population s'écoule à travers la valve dans un phénomène d'avalanche (encart en haut). La densité de population diminue et la pression est alors en partie relâchée, comme le montre le suivi de la déformation de la membrane de PDMS au cours du temps (Fig. 1.30-C, encart en bas) [73].

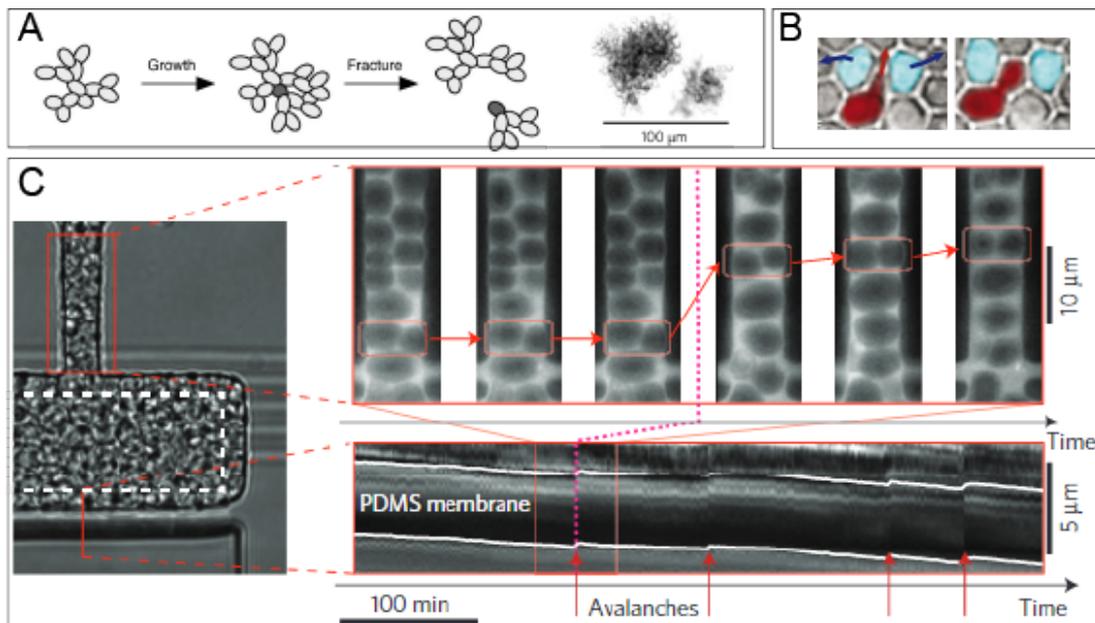


FIGURE 1.30 – Développement de chaînes de forces induites par la croissance (A) Agrégat multicellulaire de *S. cerevisiae* [241, 131]. (B) Une levure repoussant et déformant ses voisines durant sa croissance sous confinement, image adaptée de [83]. (C) Levure *S. cerevisiae* déformant une chambre microfluidique en PDMS, encarts : (en haut) le relâchement d'une chaîne de force sous confinement entraînant un phénomène d'avalanche et relâche une partie de la pression accumulée (en bas) [73].

D'autres expériences mettent en lumière le développement de forces induites par la croissance chez les levures. Des colonies de *S. cerevisiae* ou *C. albicans* incluses dans un gel d'agarose y en-

gendrent des déformations plastiques [73, 225]. Neeli-Venkata *et al.* ont également observé la déformation des cellules *S. pombe* durant la croissance de populations confinées dans des chambres déformables [212].

Minc *et al.* ont mis en évidence le développement de forces induites par la croissance à l'échelle de la cellule unique chez *S. pombe*. Pour cela, les auteurs ont incubé des levures dans des puits de PDMS de diamètre similaire à la longueur des cellules. Le comportement de la cellule semble dépendre de la rigidité de son environnement. Dans le cas de puits de PDMS de 160 kPa, la croissance polarisée de ces cellules déforme les parois. Au-delà de cette valeur, elles se déforment et flambent sous l'effet de leur propre croissance, sans parvenir à déformer ou à envahir le PDMS (voir Figure 1.31-A). En utilisant le PDMS comme capteur de force, cette expérience a permis d'évaluer les forces maximales que la levure à fission peut développer à ses extrémités à  $\sim 11 \mu\text{N}$ . Notons que cette valeur n'a pas été directement mesurée mais extrapolée, en raison du phénomène de flambage [196].

Puerner *et al.* ont également utilisé des puits de PDMS pour étudier les forces que développent les hyphes *C. albicans* pendant leur croissance. Ils ont aussi observé que le comportement invasif de l'hyphe dépend de la rigidité du substrat rencontré (voir Figure 1.31-B). Lorsque le module d'élasticité du PDMS dépasse les  $\sim 250 \text{ kPa}$ , 80% des hyphes deviennent incapables de l'envahir et se courbent sous l'effet de leur propre croissance. Ces auteurs ont estimé la force maximale développée à la pointe des hyphes à  $\sim 35 \mu\text{N}$  [234].

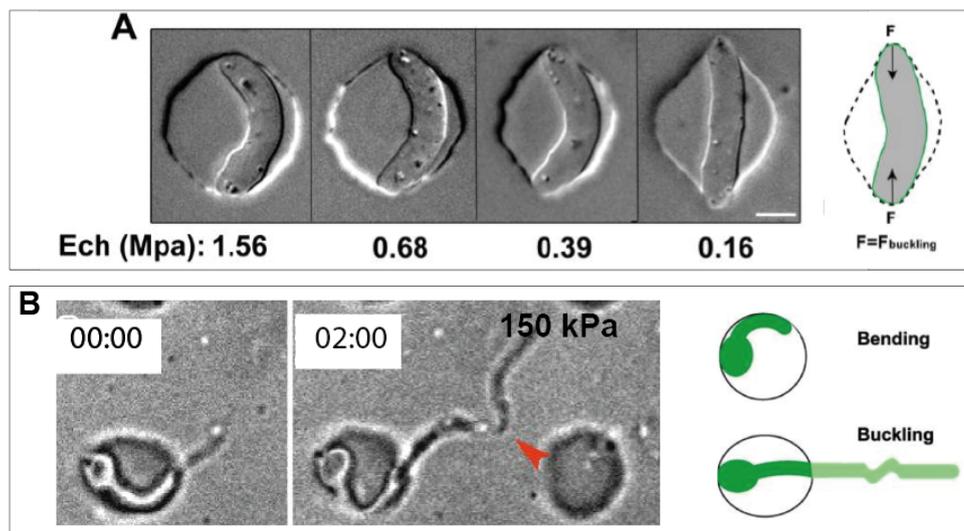


FIGURE 1.31 – Des puits de PDMS comme capteurs de forces (A) *S. pombe* déforme les parois de PDMS ou se courbe elle-même sous l'effet de sa croissance [196]. (B) *C. albicans* est capable d'envahir des substrats de PDMS de module élastique allant jusqu'à 150 kPa [234].

De manière générale, les cellules très polarisées des organismes pathogènes sont capables de développer des forces importantes à leur extrémité afin d'envahir les tissus. Ces forces dépendent en effet de la pression de turgescence de la cellule, mais aussi de sa géométrie (surface de contact avec le substrat) et de la rigidité de sa paroi cellulaire [274, 26, 27, 234, 200].

Par exemple, les parasites fongiques des plantes développent des structures recourbées, les appressoria, au contact de surfaces rigides. Pour envahir la plante, ces cellules-germes augmentent leur pression de turgescence par la synthèse de glycérol jusqu'à  $\sim 8 \text{ MPa}$  [26, 27].

L'étude de Desai *et al.* suggère un mécanisme de pénétration mécanique similaire chez *C. albicans* reposant particulièrement sur la pression de turgescence. En effet les mutants de la voie

synthèse de glycérol (délétion du gène *RHR2*) sont toujours capables produire des hyphes, mais ceux-ci sont incapables d'envahir un substrat abiotique solide contrairement à la souche sauvage (voir Figure 1.32) [79].

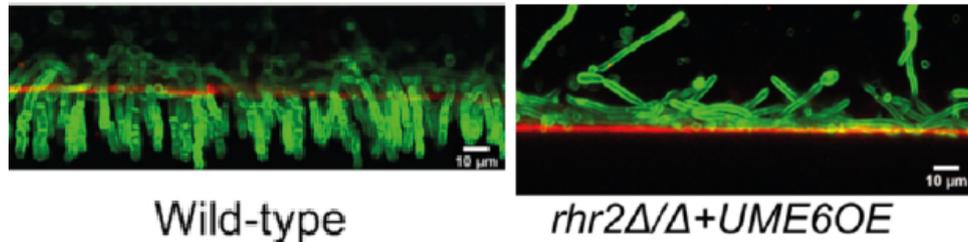


FIGURE 1.32 – Le mutant de la voie de synthèse de glycérol *rhr2Δ/Δ + UME6<sup>OE</sup>* produit des hyphes mais est incapable d'envahir le gel de polyacrylamide (module d'Young 650 kPa). Notons la surexpression du facteur de transcription *UME6*, qui permet de retrouver l'expression des adhésines *ALS3* et *HWP1*, fortement diminuées chez le mutant *rhr2Δ/Δ* [79]

### Effets de la mécanique sur la croissance des levures

Les cellules développent donc des forces compressives durant leur croissance. Nous avons vu que ces forces compressives déforment non seulement leur environnement, mais aussi les cellules elles-mêmes. Nous allons maintenant présenter les effets des contraintes compressives sur la prolifération des cellules.

#### Les forces mécaniques modulent la polarisation

Mishra *et al.* ont appliqué une contrainte mécanique uni-axiale sur des levures *S. cerevisiae* en utilisant des membranes de PDMS pressurisées (voir Figure 1.37-A). Ils ont observé que les cellules en bourgeonnement répondent à cette contrainte, en répartissant les protéines composant les complexes de polarité comme Bni1 sur toute leur surface. La dissolution de ces complexes entraîne la perte de la polarisation et la croissance devient isotropique. Les auteurs proposent que ce mécanisme prévient une fragilisation trop importante de la paroi en augmentant sa rigidité, assurant ainsi l'intégrité de la cellule face au stress [198]. De plus, lorsqu'une contrainte appliquée compromet localement l'intégrité du mur, les cellules reforment un polarisome sur un nouveau site. Elles réorientent ainsi leur polarisation sans forcément stopper leur croissance [156].

Ce phénomène de réorientation est particulièrement important chez les cellules polarisées, comme les projections invasives de *mating* chez *S. cerevisiae*, la croissance de *S. pombe* et les pathogènes filamenteux comme *C. albicans*. Comme présenté dans la partie 1.3.2, les hyphes présentent une structure particulière, le *Spitzenkörper* qui se réoriente lorsque l'extrémité de l'hyphe rencontre un obstacle physique qui le déstabilise. Chez *S. pombe*, lorsque les cellules sont déformées cela déstabilise aussi leur domaines de polarité (notamment Cdc42). Le complexe se déplace alors le long du cytosquelette d'actine jusqu'à un nouveau site permettant la croissance [114].

#### Les forces compressives ralentissent la croissance

Revenons tout d'abord aux biofilms. L'étude de Asally *et al.* [12] suggère que les forces qui se développent durant la croissance de biofilm chez *B. subtilis* engendrent localement la mort de cellules par apoptose. Les sites de mort cellulaire se localisent aux régions de fortes densités de

cellules, riches en matrice extracellulaire. Les auteurs ont mis en évidence que les ridules macroscopiques sont produites par l'hétérogénéité de la population et de ces apoptoses localisées. Bien que l'existence de gradients de nutrition ne soient pas exclue dans ces populations denses, il est possible que ce phénomène soit relié aux forces latérales induites par la croissance.

Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, plusieurs expériences *in vitro* déjà citées montrent que les forces compressives tendent à ralentir la prolifération [114, 76]. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, l'étude de Delarue *et al.* montre que la population s'accumule dans la phase  $G_1$  du cycle sous pression induite par la croissance, et que le pourcentage de lyse augmente (voir Figure 1.33) [75, 76].

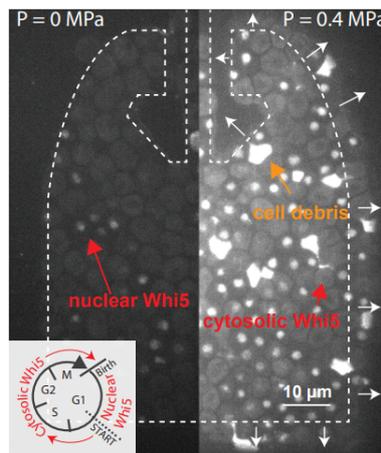


FIGURE 1.33 – Les levures *S. cerevisiae* s'accumulent en phase  $G_1$  du cycle sous pression induite par la croissance (ici 400 kPa). L'accumulation de la protéine Whi5 au noyau indique un délais en  $G_1$  (ponctua). Des débris de cellules mortes sont aussi visibles. [75].

Le ralentissement de la croissance sous contrainte mécanique a aussi été étudié sur cellule unique. Par exemple, la vitesse d'élongation de *S. pombe* ralentit lorsque la cellule pousse contre des parois de PDMS [196] (Fig. 1.34-A). Chez *C. albicans* les hyphes présentent un comportement similaire. Leur vitesse d'élongation dans du PDMS à 150 kPa est quasiment deux fois plus faible qu'en surface (Fig. 1.34-B) [234].

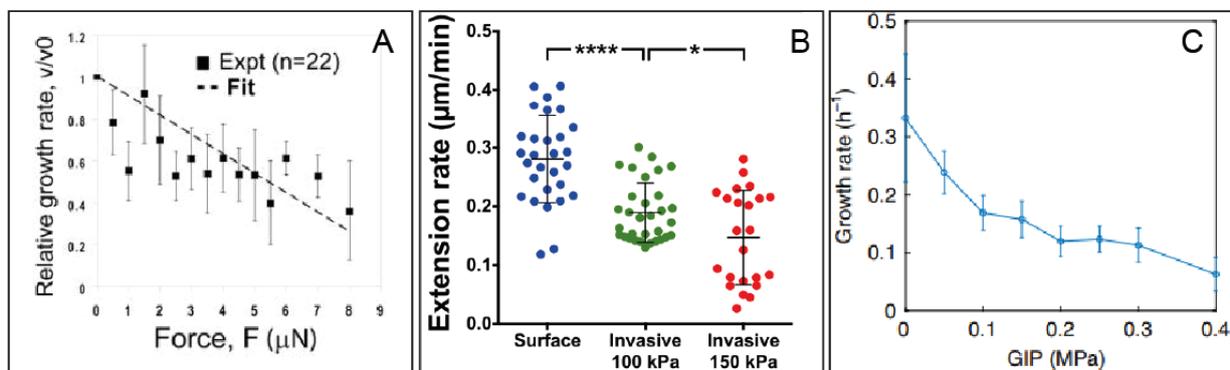


FIGURE 1.34 – Les forces compressives limitent la croissance. (A) *S. pombe* : la vitesse d'élongation diminue avec la force développée par la croissance contre les parois de PDMS [196]. (B) *C. albicans* : la vitesse d'élongation de l'hyphe diminue avec la rigidité du PDMS durant l'invasion [234]. (C) *S. cerevisiae* : le taux de prolifération diminue avec la pression induite par la croissance [7].

Les cellules sont également soumises à la variation de la pression osmotique dans leur environnement [276, 172]. Les contraintes compressives et le confinement limitent le volume disponible pour la croissance de la cellule. *In vitro*, les chocs hyper-osmotiques permettent de récapituler en partie ces contraintes mécaniques. En effet ils engendrent une diminution temporaire de la pression de turgescence, du volume cellulaire, et un stress de la paroi. Plusieurs études chez les levures [196, 114, 7], les bactéries [172], les plantes [275] et différents pathogènes fongiques [173, 97] montrent que les chocs hyper-osmotiques ralentissent la croissance des cellules.

Chez *S. cerevisiae*, Alric *et al.* [7] ont montré que le taux de division diminue exponentiellement avec la force compressive développée par la croissance de la population (Fig. 1.34-C). Ces auteurs suggèrent que le ralentissement de la prolifération est en fait relié à l'augmentation de l'encombrement intracellulaire<sup>10</sup>. L'encombrement intracellulaire peut être mesuré en suivant les déplacements de nanoparticules décorées de protéines fluorescentes<sup>11</sup> encodées par des cellules mutantes [72]. Le coefficient de diffusion "effectif" (à 10 ms) de ces nanoparticules donne une image de la mobilité des espèces dans la cellule, et donc de l'encombrement. Les auteurs ont montré que le coefficient de diffusion effectif de ces nanoparticules décroît avec la pression de croissance. L'encombrement intracellulaire peut également être augmenté sous choc hyper-osmotique. Dans le cas de chocs hyper-osmotiques, les auteurs utilisent une souche dans laquelle la voie d'osmo-adaptation est inactivée pour maintenir durablement la diminution de volume des cellules (*hog1Δ*).

L'étude montre ainsi que le taux de production de protéines essentielles ("*house-keeping*") diminue avec la pression appliquée, et semble suivre l'augmentation de l'encombrement, qu'il soit d'origine mécanique (confinement) ou osmotique. Finalement, le taux de croissance et le taux d'expression effectif sont corrélés sous contraintes compressives (Fig. 1.35), la limitation de production protéique pouvant diminuer le taux de croissance. A partir de ces résultats les auteurs proposent un modèle qui récapitule le comportement des levures proliférant en environnement confiné obtenu expérimentalement (taux de croissance, taux de production de protéines).

Cette étude souligne l'importance de phénomènes biophysiques dans la physiologie cellulaire et comment des mécanismes non-spécifiques peuvent devenir limitants à des fonctions aussi essentielles que la croissance et la division, en modulant la dynamique des cascades moléculaires. Cependant, cela n'exclut pas l'existence de voies biologiques de transduction du signal de stress mécanique et d'adaptation. Nous allons maintenant présenter quelques-unes de ces cascades de signalisation, et les protéines mécanosensibles conservées chez les levures.

### Les voies d'intégration d'un stress mécanique chez les levures

Plusieurs études suggèrent la présence de voies *mécanosensibles* impliquées dans la réponse aux contraintes compressives. Ces cascades de signalisation convertissent les forces mécaniques en signaux chimiques. Elles participent à divers mécanismes comme la polarisation de la croissance, la biosynthèse du mur, l'adaptation du métabolisme ou la progression dans le cycle.

Deux classes de protéines membranaires mécanosensibles conservées chez *S. pombe*, *C. albicans* et *S. cerevisiae* sont particulièrement décrites dans la littérature : les protéines de la famille *Wsc*, et les canaux ioniques de calcium.

10. L'encombrement macromoléculaire décrit l'ensemble des propriétés qui impactent le mouvement des espèces dans la cellule. Entrent ainsi dans cette définition la composition en taille et la concentration des différentes espèces, les potentielles interactions qu'elles peuvent avoir, mais également l'activité biochimique.

11. GEMs : Genetically Encoded Multimeric nanoparticles, particules traceurs de 40nm, génétiquement encodées qui diffusent librement dans le cytoplasme des cellules.

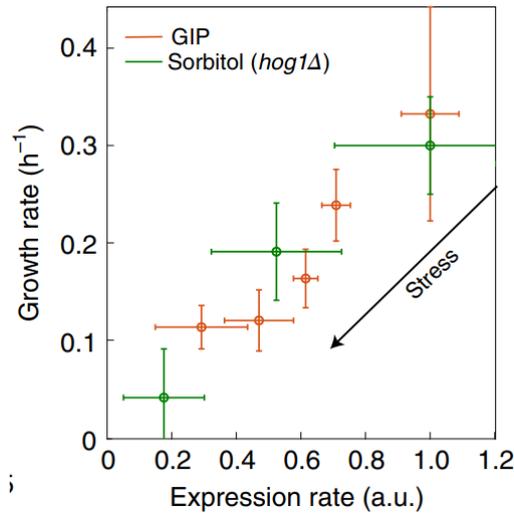


FIGURE 1.35 – Le taux de production de protéines est corrélé au coefficient de diffusion et tous deux diminuent sous pression hyper-osmotique (en vert) et sous pression induite par la croissance sous confinement (en orange) [7].

Nous avons évoqué l'existence des canaux ioniques de calcium chez *C. albicans* et leur rôle potentiel dans la réponse thigmotropique dans la partie 1.3.2. Ces canaux agissent en augmentant la concentration locale en ions dans le cytoplasme ce qui favorise la fusion des vésicules à la membrane plasmique [289].

Ces canaux existent aussi chez le pathogène fongique des plantes *Uromyces appendiculatus*. Une étude a montré que la formation de l'appressorium peut être induite *in vitro* sur des surfaces de polystyrènes qui présentent des topographies (rainures ou crêtes). A des hauteurs topographiques de 250 nm et 1  $\mu$ m, la part de cellules qui se différencie est de 5%. En revanche, la formation de l'appressorium est particulièrement stimulée à la hauteur 500 nm, condition pour laquelle 75 % de la population se différencie. Cette hauteur spécifique correspond aux topographies présentes sur les cellules des plantes, ce qui suggère un mécanisme particulièrement sensible et adapté à cet environnement [120].

Une seconde étude a observé que les canaux ioniques sont actifs sur toute la surface des cellules produisant les appressoria. Les auteurs proposent que cette activité participe à l'initiation de la morphogénèse chez *U. appendiculatus* [320]. L'activité des canaux ioniques peut être réprimée en présence de gadolinium  $Gd^{3+}$ . Lorsque cette espèce est ajoutée au milieu, elle inhibe effectivement la différenciation chez *U. appendiculatus* et la réponse thigmotropique de *C. albicans*.

Chez *S. cerevisiae*, Mishra *et al.* ont également montré que ces canaux ioniques transmettent des signaux de stress mécaniques. Ils seraient particulièrement actifs aux sites d'expansion de la paroi, près du site de contact avec l'obstacle. L'activation des canaux calciques composés de Mid1 et Cch1 entraîne la transduction du signal par la voie spécifique du complexe calcineurine (voir Figure 1.37-B). Les auteurs ont aussi montré que ces mécano-senseurs coopèrent avec la voie de signalisation d'intégrité de la paroi CWI (*Cell-Wall Integrity*) pour inhiber la polarisation sous stress mécanique et assurer la survie [198].

La cascade de signalisation CWI comporte notamment la GTPase Rho1 et la protéine kinase C Pkc1 qui sont conservées chez les trois levures (Fig. 1.36). Lorsqu'elle est active, Pkc1 est recrutée à la membrane où elle antagonise la polarisation du cytosquelette d'actine, ce qui inhibe la croissance anisotropique (voir Figure 1.37-C,D).

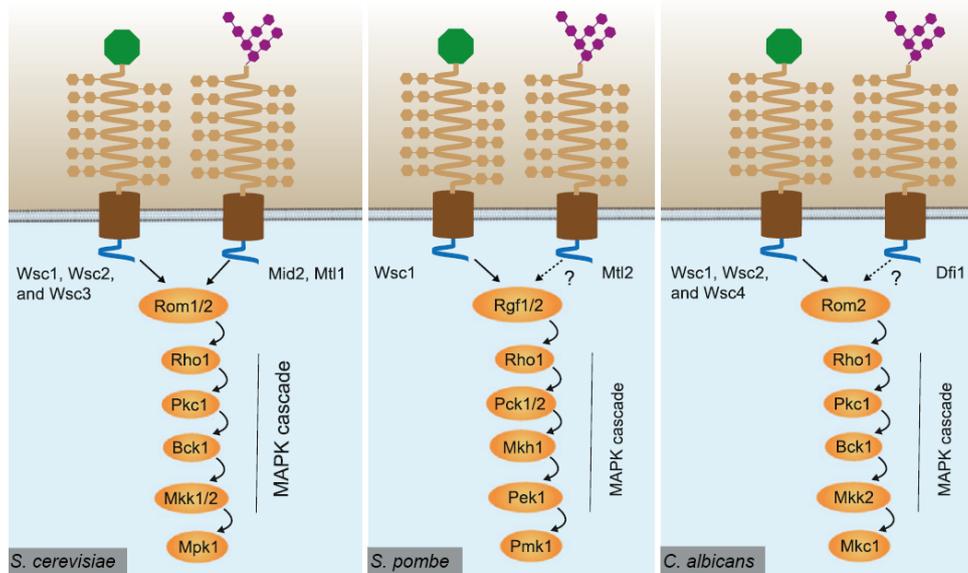


FIGURE 1.36 – La cascade de signalisation mécanosensible CWI (*Cell-Wall Integrity*) est conservée chez les levures *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *C. albicans*. Illustration issue de l'article de Mishra *et al.* [197].

Chez *S. cerevisiae*, plusieurs mécanosenseurs peuvent activer cette voie : les Wsc1-3 et Mid2/Mtl1. Mishra *et al.* suggèrent que la protéine de surface Mid2 est spécifiquement activée sous contrainte mécanique. Mid2 (*Mating-Induced Death 2*) est une protéine transmembranaire qui contient une courte partie intracellulaire et un domaine extra-cellulaire riche en sérine et thréonine (*STR*). Des études à l'AFM (microscopie à force atomique) de ses propriétés mécaniques ont montré que ce domaine se comporte comme un nano-ressort élastique [85]. Cela suggère que cette protéine est directement impliquée dans la conversion de forces physiques en signaux biochimiques.

Les mécanosenseurs Wsc1-3 contiennent également des domaines *STR* [85]. Revenons à l'étude de Neeli *et al.* chez *S. pombe*. Mtl2, et son homologue Mid2 chez *S. cerevisiae*, restent répartis sur toute la surface de la paroi cellulaire. *A contrario* chez *S. pombe*, Wsc1 se localise aux sites de croissance [63, 150]. Récemment, ce groupe a observé que Wsc1 s'accumule aussi aux sites de compression de la paroi cellulaire. Wsc1 forme alors des agrégats, indépendamment des complexes de polarité qui l'impliquent habituellement aux sites de croissance active [212].

Les auteurs ont observé que l'accumulation de Wsc1 dépend de l'intensité et de la durée de la force appliquée (Fig. 1.38-A,B). Ces agrégats sont réversibles et très dynamiques, ils se forment et se désagrègent en quelques minutes suivant l'oscillation de la force appliquée. Les auteurs proposent que la compression de la paroi cellulaire contre la membrane limite localement la diffusion des protéines Wsc1 à l'interface, aboutissant à leur accumulation (Fig. 1.38-C). Plusieurs études proposent que ce type d'agrégats amplifie la réponse au stress mécanique, à la manière des agrégats d'intégrines chez les cellules animales qui se forment le long de topographies [150, 86].

Une autre voie de signalisation spécifique aux contraintes compressives a été découverte récemment chez *S. cerevisiae*, la voie SMuSh (Ste11 through Mucin / Sho1) [75]. Les auteurs ont montré que la survie des cellules durant un stress compressif prolongé (plusieurs cycles cellulaires) dépend en partie de l'activation de la protéine membranaire Sho1. Cette protéine est connue pour son implication dans la voie MAPK d'osmo-adaptation qui cible la MAP kinase Hog1 (*High-Osmolarity Glycerol 1*) via la kinase de transduction de signal Ste11.

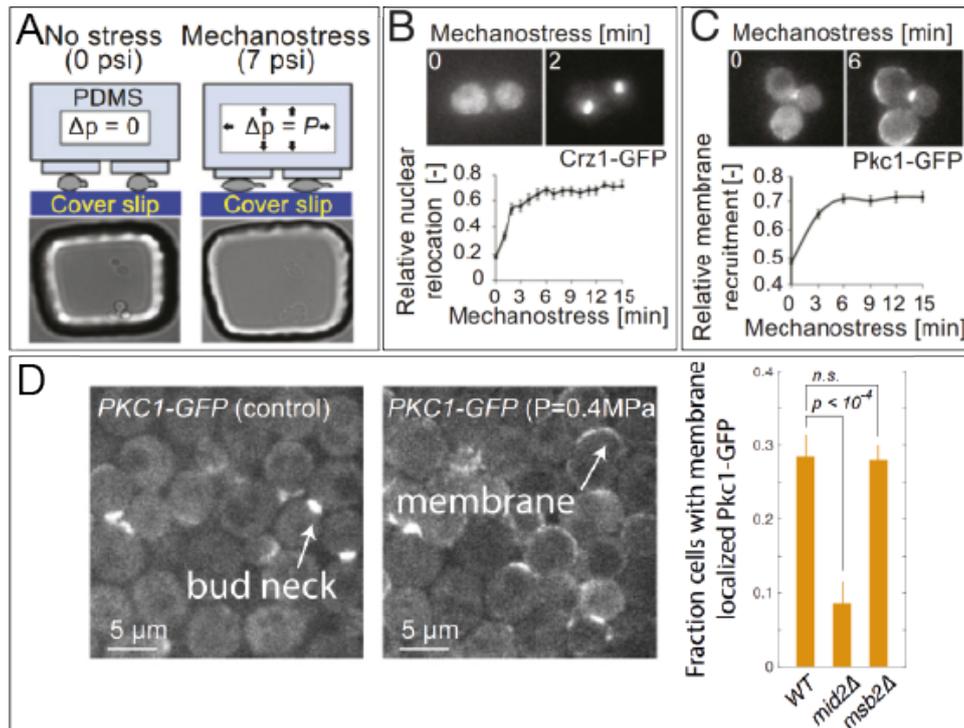


FIGURE 1.37 – Recrutement de voies mécanosensibles chez *S. cerevisiae*. **(A)** L'actionnement pneumatique de la valve de PDMS permet d'écraser les cellules situées dans une chambre microfluidique en dessous [198]. **(B)** La compression des cellules recrute le facteur de transcription Crz1, ciblé par la voie calcium-dépendante [198]. Les forces mécaniques recrutent la kinase Pkc1 à la membrane, aux sites de stress dus au confinement spatial, **(C)** lorsque les cellules sont écrasées [198], ou **(D)** comprimées les unes contre les autres [76]

Ste11 a pour autre cible la voie de croissance invasive de *S. cerevisiae*, à travers la kinase Kss1. L'analyse du taux de survie chez différents mutants de ces voies révèle qu'elles sont toutes deux nécessaires à la survie et semblent fonctionner en synergie. 60% des cellules meurent sous pression lorsqu'elles sont toutes deux inactivées (*kss1* $\Delta$ *hog1* $\Delta$ ). Les auteurs ont identifié en amont de ces voies la mucine transmembranaire Msb2 qui forme avec Sho1 un module transducteur du signal mécanique. En effet, 60% des cellules meurent sous 400 kPa chez le mutant *msb2* $\Delta$ , récapitulant le comportement du double mutant *kss1* $\Delta$ *hog1* $\Delta$ .

La voie SmuSh et la voie CWI ne sont pas indispensables à la prolifération hors confinement. En revanche elles synergisent et deviennent essentielles à la survie sous pression induite par la croissance. En effet, chez le double mutant *ste11* $\Delta$ *slt2* $\Delta$ , ces deux voies sont inactivées et 100% des cellules meurent sous pression (Fig. 1.39-A,B). Notons cependant que ce mécanisme de survie se déroule à des échelles de temps relativement longues (plusieurs heures). La lyse du mutant de la voie SmuSh *ste11* $\Delta$  n'intervient pas sous la compression instantanée par une membrane de PDMS.

Finalement, le mécanisme par lequel Msb2 détecte les forces physiques n'est pas encore élucidé mais pourrait impliquer le clivage de son domaine extracellulaire par la protéase Yps1 située à la membrane plasmique [280].

Deux autres mécanismes pourraient hypothétiquement participer à la détection de contacts physiques.

Les récepteurs membranaires de la famille GPCR (*G-protein-coupled receptors*) sont sensibles

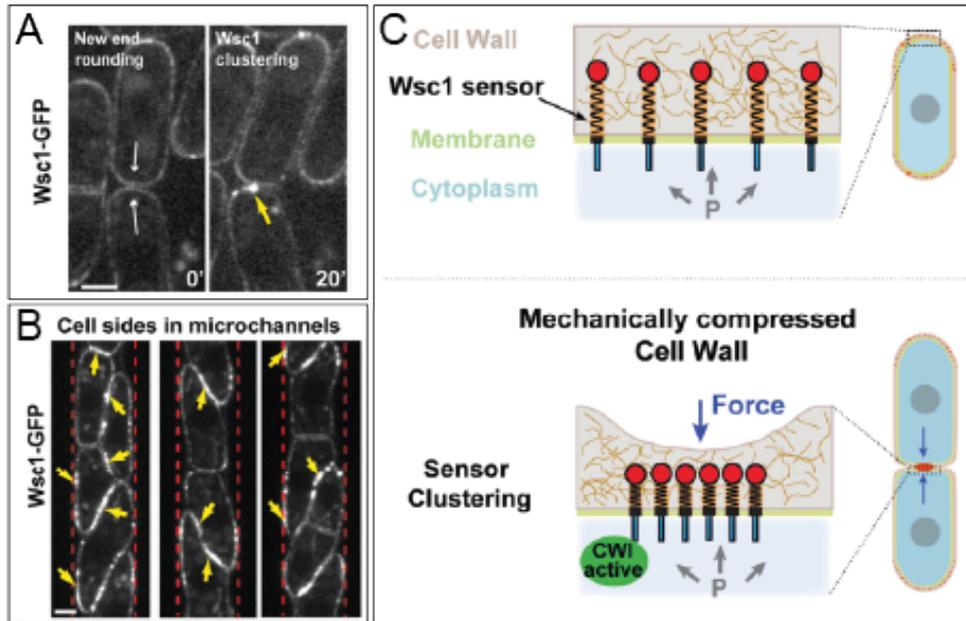


FIGURE 1.38 – Accumulation de la protéine Wsc1-GFP aux sites de contact cellule-cellule sans confinement (A), mais aussi au contact cellule-substrat dans un canal de PDMS (B). (C) Modèle de détection de contraintes compressives chez *S. pombe* via Wsc1 proposé par Neeli *et al.* [212].

à la présence de glucose chez *S. cerevisiae*. Gpr1 en particulier, se lie directement aux sucres (glucose, sucrose) et agit comme un "capteur". Or chez des cellules animales, certaines protéines GPCR présentent des propriétés mécanosensibles. Chachisvilis *et al.* ont utilisé une forme modifiée d'une GPCR permettant l'imagerie FRET<sup>12</sup> chez des cellules animales endothéliales. Ils ont observé des changements de conformation de la protéine sous choc hypotonique, mais aussi sous contraintes hydrodynamiques (forces de cisaillement sous écoulement d'un fluide) [50]. Il est possible que de tels mécanismes soient conservés chez les levures.

Enfin, Mishra *et al.* suggèrent dans leur récente revue que la voie TORC2 (*Target Of Rapamycin Complex 2*) pourrait répondre à des stimuli mécaniques. En effet, ce complexe se situe au niveau de la membrane plasmique, près des sites d'endocytose et plus exactement près des éisosomes<sup>13</sup>. Ces domaines agissent comme de petits réservoirs membranaires qui permettent aux cellules de renouveler rapidement leur membrane lorsqu'elle est compromise. Lorsque que la tension de membrane augmente (augmentation de la pression de turgescence, choc hypo-osmotique) les éisosomes s'étirent eux aussi et déclenchent la signalisation TORC2. En retour, l'activation de TORC2 module la synthèse de la membrane [30].

12. Le FRET est une technique d'imagerie reposant sur le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes par couplage dipôle-dipôle. Le transfert d'énergie dépend de la distance entre les molécules et modifie le spectre d'émission du fluorophore accepteur.

13. Les éisosomes sont des structures subcellulaires situées à la membrane plasmique chez les levures. Ils comprennent des protéines et composants membranaires. Les protéines de l'éisosome forment une structure rigide en forme de coque accrochée à la membrane interne.

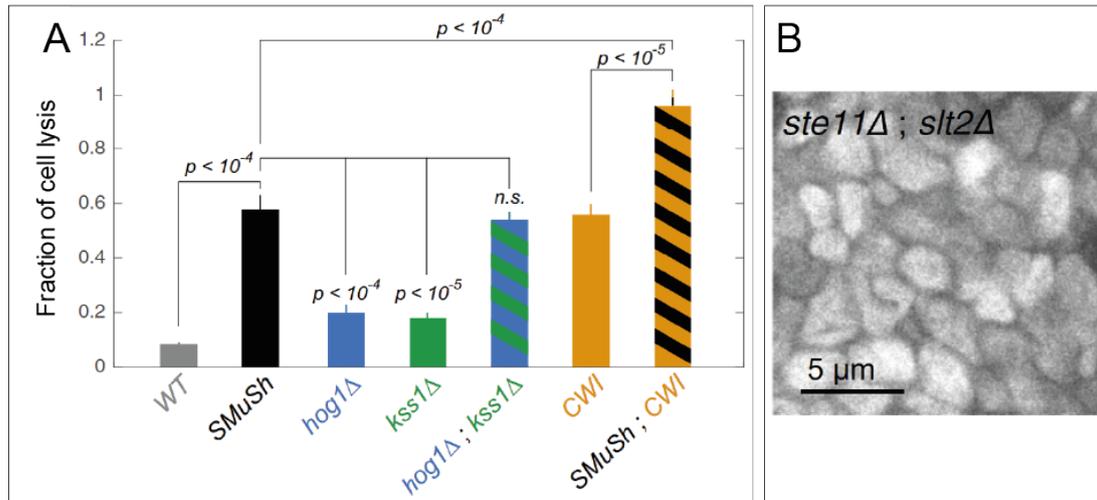


FIGURE 1.39 – (A) Fraction de cellules lysées sous pression (400 kPa) chez des mutants de la voie osmotique (en bleu); de la voie de la filamentation (en vert); de la voie SmuSh (en noir); de la voie CWI (en jaune). (B) Le double mutant des voies SmuSh et CWI ne survit pas sous pression prolongée (400 kPa) [75].

## 1.5 Est-ce-que la mécanique favorise la virulence de *C. albicans*?

Nous venons de voir que les cellules développent des forces compressives durant leur croissance, particulièrement dans le cas de populations denses ou confinées. Plusieurs voies mécanosensibles sont décrites chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* qui participent à moduler la physiologie cellulaire et semblent conservées chez *C. albicans*. De manière générale, l'activation de ces voies de signalisation semble limiter la croissance et la polarisation afin d'assurer l'intégrité cellulaire. En parallèle, les contraintes compressives encombrant progressivement les cellules proliférant dans un environnement confiné. Ce phénomène biophysique limite les réactions intracellulaires, entraînant aussi une diminution du taux de croissance.

Dans cette partie, nous allons proposer quelques contextes physiologiques dans lesquels *C. albicans* pourrait rencontrer des forces compressives en lien avec la virulence. Nous décrirons également les voies de signalisation reliant contact physique et morphogénèse connues à ce jour.

### 1.5.1 Dans quels contextes la mécanique pourrait-elle être impliquée?

#### Les biofilms

La littérature suggère que l'initiation de biofilms chez *C. albicans* passe par l'adhérence et la formation d'une couche basale de levures. Vient ensuite la croissance tridimensionnelle avec l'émergence des hyphes qui marque l'initiation du biofilm (voir partie 1.1.4 [80]). Si l'adhérence constitue une étape essentielle à la formation du biofilm, les paramètres physiques ou chimiques qui mènent ensuite à la morphogénèse ne sont pas tout à fait élucidés. En effet, les études publiées à notre connaissance utilisent des signaux physico-chimiques (élévation de température, ajout de sérum par exemple) durant la phase d'adhérence [80]. Ces signaux viennent se superposer aux éventuels paramètres mécaniques comme les forces de contact surface-cellule et cellule-cellule, ou le stress en cisaillement [191].

Ainsi, une part des études observent que des hyphes débutent leur croissance dans les 2 à 4 h suivant l'adhérence et ce avant que la population ne soit confluyente sur la surface [191]. D'autres modèles *in vitro* suggèrent que les hyphes n'émergent qu'après un à plusieurs niveaux de levures ne soient empilés, formant un tapis épais estimé à 20  $\mu\text{m}$  [265, 68].

Il est possible que la transition levure-hyphe soit modulée par des forces latérales lorsque la population arrive à confluence, ou qu'elle soit favorisée par le confinement de la couche basale par les couches supérieures. En particulier sur des surfaces abiotiques très rigides (cathéter, appareil dentaire, dispositif intra-utérin) les topographies pourraient contribuer au développement de telles forces (Fig. 1.40-A). Nous avons vu dans la partie précédente que ces forces émergent aussi chez des biofilms microbiens, favorisant des comportements hétérogènes. De plus dans l'appareil digestif les mouvements péristaltiques pourraient surajouter des forces de tension et de compression dans la population dense de cellules. Ces différentes propositions sont schématisées figure 1.40-B.

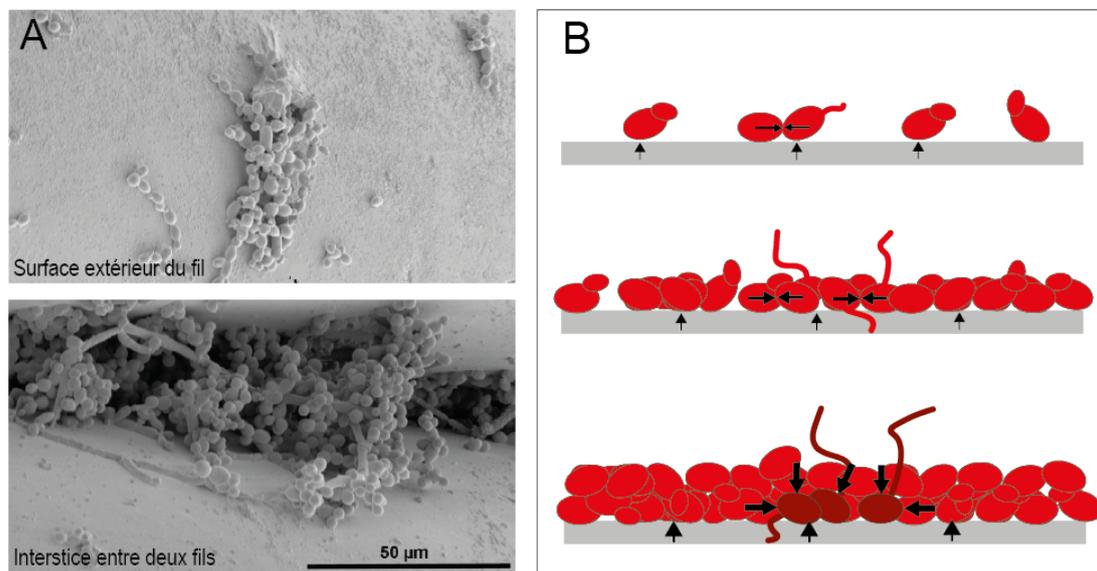


FIGURE 1.40 – (A) Agrégats et biofilms développés *in vitro* sur un dispositif intra-utérin (48 h, RPMI, 37°C, sous agitation). La formation de biofilms 3D comportant des hyphes semble stimulée dans les interstices formés par les fils de cuivre (image du bas) [309]. (B) Schéma des forces en jeu durant le développement de biofilms.

### Confinement dans des tissus

Nous avons vu dans la partie 1.1.3 que chez *C. albicans*, le morphotype levure contribue à la propagation du pathogène par dissémination dans l'hôte durant l'infection. De plus les levures semblent capables de s'infiltrer dans les tissus comme le montrent les coupes histologiques chez des modèles murins de candidémies, figure 1.41-A,B. Ces inclusions semblent mener au développement d'abcès dans lesquels la levure prolifère et filamente (Fig. 1.41-C). De plus l'inflammation des tissus infectés augmente leur rigidité [269].

Revenons également à la colonisation opportuniste de l'appareil digestif. L'endothélium qui le compose présente des topologies de dimensions variées, de l'intestin grêle au colon. En particulier, ces deux organes présentent des cryptes profondes et larges de plusieurs dizaines de micromètres. Chez l'hôte sain, la paroi intestinale est tapissée d'une couche épaisse de mucus. Cette

matrice composée de mucines est riche en composés antimicrobiens, elle prévient aussi l'accès à l'endothélium par encombrement stérique [169, 110]. Plusieurs modèles suggèrent que la barrière du mucus est altérée dans différents contextes pathologiques (prise de médicaments, constipation notamment) [192, 99]. Les microbes pathogènes pourraient alors avoir accès aux cryptes et s'y trouver confinés auprès de l'endothélium.

Il est envisageable que des forces compressives émergent dans ces contextes assimilables à de la prolifération confinée, et modulent potentiellement la filamentation (schématisé Figure 1.41-E).

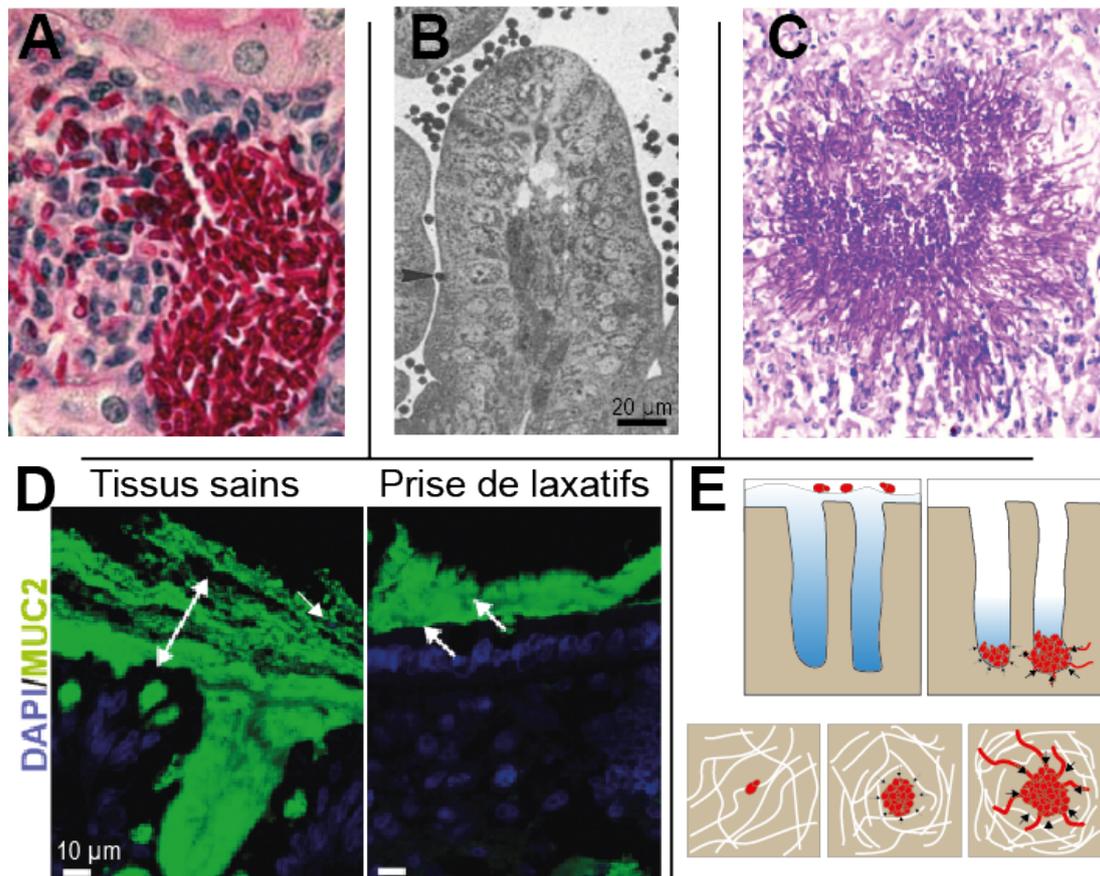


FIGURE 1.41 – (A) Coupe histologique de levures infiltrées dans un tissu (mutant *efg1/cph1*) [297]. (B) Infiltrations de levures entre les villosités du colon (flèche) [59]. (C) Lésion pulmonaire, des hyphes sont visibles en périphérie de l'abcès [107]. (D) Coupe histologique marquée en fluorescence, DAPI : ADN microbiens et cellules animales, MUC2 : mucus. Chez le patient sain, le mucus encombre les cryptes et fait obstacle aux bactéries. En cas de pathologie, le mucus est plus mince et laisse passer les bactéries (flèches). [135]. (E) La prolifération de *C. albicans* pourrait être confinée dans plusieurs contextes *in vivo*, et engendrer des forces compressives.

### La phagocytose

Les forces physiques pourraient également entrer en jeu durant la phagocytose que nous avons évoquée dans la partie 1.1.4. En effet les phagocytes développent des protrusions, les lamellipodes, qui l'arriment à l'organisme à éliminer. Ils entourent alors progressivement leur cible et forme une structure en "coupe" durant l'initiation du phagosome. Pour cela ils recrutent des composants de leur cytosquelette, dont la F-actine, et allongent le phagosome jusqu'à englober entièrement le microbe.

Plusieurs mécanismes permettent de maintenir l'intrus durant ce processus, notamment le recrutement de protéines membranaires qui interagissent avec des protéines cibles à la surface de l'intrus. Une étude récente de Vorselen *et al.* suggère que le phagosome forme un anneau de F-actine dont la dynamique dépend de la rigidité et de la forme de l'objet phagocyté. En utilisant des billes d'hydrogels (acrylamide) marquées en fluorescence, ils ont observé que celles-ci sont déformées par le phagosome. Dans la figure 1.42-A, on peut voir l'aspect de l'une de ces billes de  $\sim 14 \mu\text{m}$  de diamètre et de module d'élasticité 0,3 kPa durant sa phagocytose. En connaissant les propriétés mécaniques des billes, les auteurs ont pu évaluer les déformations engendrées par TFM (*Traction Force Microscopy*). Ils ont estimé que les forces compressives sont de l'ordre de 20 à 100 Pa [292], et augmentent à 400 Pa avec des billes plus rigides (1,4 kPa) [291]. Le schéma figure 1.42-B présente la direction de forces impliquées selon ces auteurs.

Le module élastique de *C. albicans* est bien plus important, de l'ordre du mégapascal [96], et il est difficile d'extrapoler le comportement mécanique du phagosome en réponse. Il reste cependant plausible que *C. albicans* ressente des forces compressives durant la phagocytose.

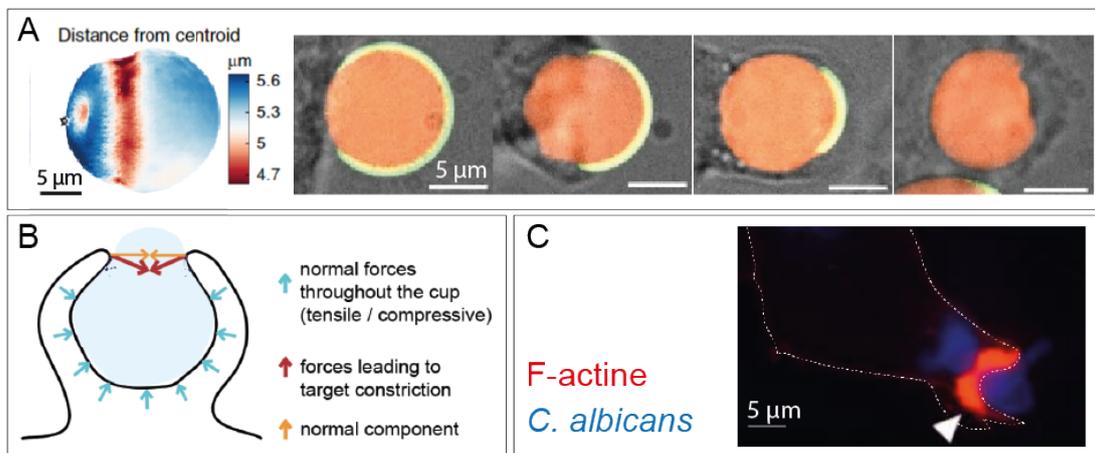


FIGURE 1.42 – (A) Un phagocyte développe des forces compressives qui déforment une bille d'hydrogel (module d'Young 0,3 kPa) [292]. (B) Schéma des différentes force engendrée par le phagosome, illustration issue de l'article de Vorselen *et al.* [291]. (C) Un macrophage recrutant la F-actine pour phagocytter des levures *C. albicans* [270]

### 1.5.2 Quelles seraient les voies d'intégration d'un stress mécanique chez *C. albicans*?

Dans une récente étude, Kollu *et al.* ont montré que des surfaces nanostructurées répriment la morphogénèse, même avec l'addition de sérum à 37°C. Ces structures présentent des piliers de 200 nm de haut et de large, espacés de 200 nm. Notons que les artefacts d'interaction chimique avec la surface ont été limités par l'ajout d'une couche d'or. L'adhérence de *C. albicans* est également réduite sur ces surfaces et les topographies déclenchent l'augmentation de la part de chitine dans la paroi cellulaire, ce phénomène est une des signatures de stress du mur. Les cellules sont également moins viables sur ces surfaces et le pourcentage de mort double en 24 h par rapport à la condition contrôle sans nanostructures [154]. Les voies de signalisation impliquées ne sont pas encore élucidées.

Cependant, plusieurs voies de signalisation pourraient relier la transition levure vers hyphe chez *C. albicans* aux contraintes mécaniques.

Puerner *et al.* proposent que la voie mécanosensible *SmuSh* pourrait contribuer à moduler l'extension des hyphes lorsqu'ils envahissent un substrat rigide (Fig. 1.31-B). En effet, ils ont observé le recrutement de Cdc42, une GTPase essentielle au maintien de la polarisation à l'extrémité de l'hyphe (Fig. 1.43-A). Or, chez *S. cerevisiae* la mucine *Msb2* interagit directement avec Cdc42 et l'active, ce qui contribue à maintenir la polarisation apicale [64]. En parallèle les forces compressives dépolarisent la Rho-GTPase Rho1 (Fig. 1.43-B). Cette protéine participe aussi à l'établissement de la polarisation et elle est conservée chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *C. albicans* dans la voie CWI (voir Figure 1.36). Les auteurs spéculent que ces deux voies pourraient moduler la croissance polarisée sous pression. La voie CWI entretiendrait la rigidification de la paroi subapicale, via la dépoliarisation de Rho1 par Mid2. La voie *SmuSh* concentrerait l'action apicale de Cdc42 via *Msb2* pour maintenir la polarité [234]. Ces voies mécanosensibles pourraient aussi avoir un impact sur l'engagement dans le programme de transition levure vers hyphe.

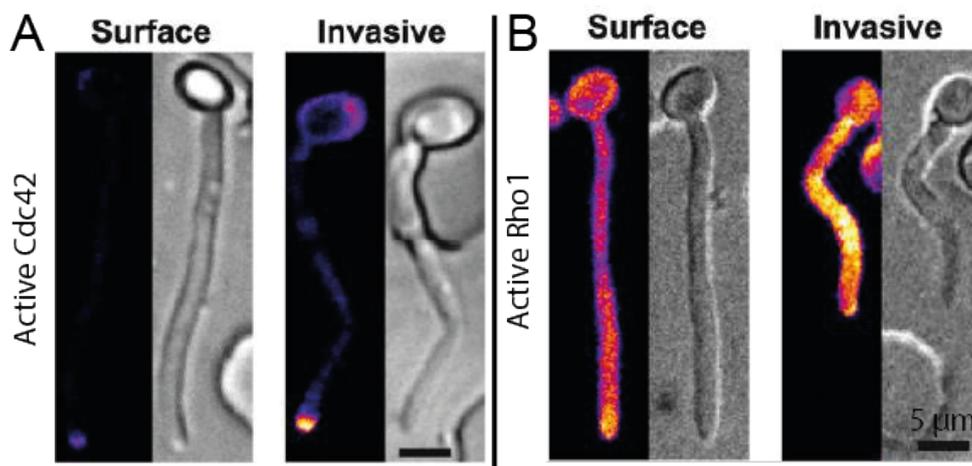


FIGURE 1.43 – Les complexes de polarité sont recrutés différemment le long de l'hyphe durant la croissance sous contraintes compressives (PDMS de rigidité ~150 kPa) (A) Accumulation apicale de la forme active Cdc42•GTP sous croissance invasive (B) Dépoliarisation de Rho1 qui se répartit le long de tout le filament [234]

La croissance sur une surface solide ou un hydrogel semble aussi favoriser la filamentation, à tel point que de nombreuses études *in vitro* évaluent en parallèle la filamentation en milieu liquide, et sur milieu semi-solide. L'initiation de la filamentation est d'autant plus rapide lorsque *C. albicans* est inclus dans un milieu semi-solide, comme une gélose d'agar [225].

Pour réaliser ces inclusions, Brown *et al.* ont mélangé un peu de milieu nutritif contenant des cellules avec du milieu nutritif contenant de l'agar (voir exemple fig. 1.44-B-D). Ils ont ainsi découvert que le facteur de transcription *Czf1* module directement la croissance hyphale incluse dans un milieu semi-solide [43]. Le mutant *efg1Δ/Δ* est peu sensible à de nombreux stimuli d'induction (sérum, température par exemple). La filamentation robuste de ce mutant en inclusion dans l'agar est ainsi attribuée à *Czf1*. De plus, la surexpression de *Czf1* diminue le délai d'initiation de la croissance hyphale en milieu solide. Les auteurs proposent que des contraintes compressives émergent de la croissance des colonies en inclusion, et stimulent la filamentation.

La filamentation en milieu semi-solide est aussi régulée via le facteur de transcription *Cph1*. Les auteurs ont montré que le double mutant *czf1Δ/Δcph1Δ/Δ* filamente très peu par rapport

à la souche sauvage en milieu semi-solide sous plusieurs conditions chimiques et températures testées. En revanche ce double mutant reste capable de filamenter en présence d'autres stimuli en milieu liquide à 37°C.

Dans des expériences similaires, Zucchi *et al.* ont découvert l'implication de la glycoprotéine Dfi1 [322]. Ils proposent que cette protéine de surface est mécanosensible, car la délétion de *DFI1* atténue spécifiquement la filamentation en milieu semi-solide. Le recrutement de Dfi1 entraîne en retour l'activation de la MAP kinase Cek1 qui cible notamment le facteur de transcription Cph1.

Dfi1 se situe dans la membrane plasmique et comporte des domaines qui peuvent se lier de manière covalente aux polymères présents sur la face interne du mur. Enfin, l'étude suggère qu'elle pourrait elle aussi former des agrégats à la surface cellulaire, à la manière de Wsc1 chez *S. pombe* (Fig. 1.44-E). Finalement, l'étude n'exclut pas l'implication du complexe Msb2/Sho1 eux aussi en amont de la cascade MAP kinase Cek1. En effet le mutant *msb2* $\Delta/\Delta$  présente un délai avant de filamenter en agar (Fig. 1.44-D) [242].

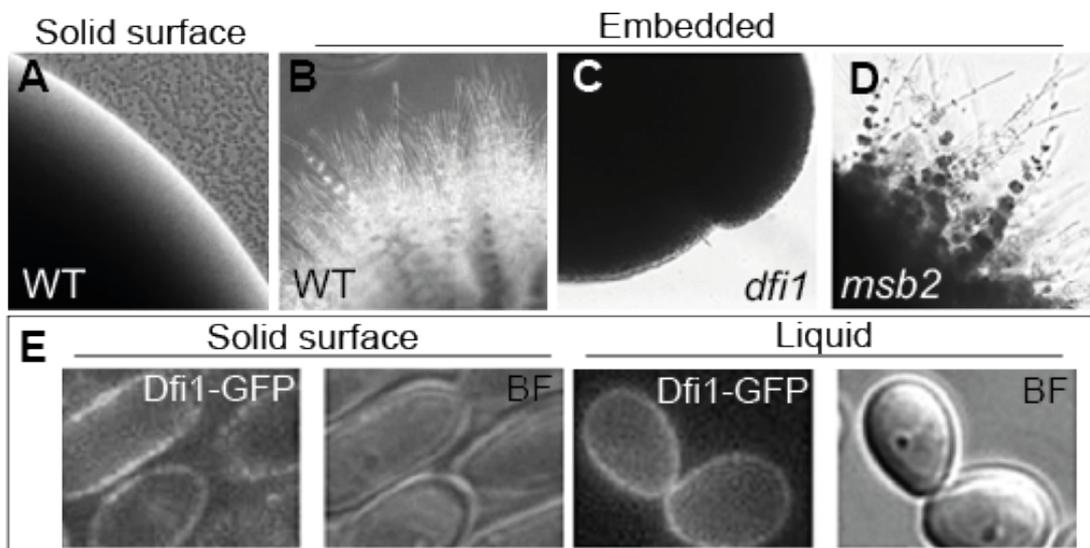


FIGURE 1.44 – Morphologie de colonies sauvages en YPD à 25°C après 72 h, (A) à la surface d'une gélose d'agar, (B) inclusion dans l'agar [43]. Croissance en milieu semi-solide YPS avec 1% d'agar après 96 h à 25°C (C) mutant *dfi1/dfi1* (D) mutant *msb2/msb2*. (E) Croissance de souches sur milieu YPD à 30°C (solide ou liquide). La protéine Dfi1 se localise à la périphérie des cellules. Notons la présence de potentiels agrégats durant la croissance sur milieu solide (image à gauche) [322]

Cependant notons plusieurs limitations à ces expériences. Tout d'abord les auteurs ont mélangé les cellules dans de l'agar liquide, or l'agar commence à se solidifier en dessous de 40°C environ. Cela implique que les cellules subissent une élévation importante de température au début de l'expérience, favorable à la filamentation. De plus les auteurs décrivent uniquement l'aspect macroscopique des colonies ("avec" ou "sans" hyphes en périphérie) après 24 h. Il est donc difficile d'estimer quand l'initiation d'hyphes a lieu, et si elle est due à la température ou à l'aspect mécanique. D'autre part les nutriments parviennent aux cellules uniquement par diffusion dans la matrice. Il n'est donc pas exclu que des gradients d'appauvrissement en nutriments s'établissent durant la croissance et modulent la réponse des cellules.



# Résumé

Cette introduction nous a permis de souligner l'importance clinique de la levure *C. albicans* en tant que pathogène opportuniste chez l'humain, et comment cet organisme s'adapte aux multiples environnements qu'il rencontre. Dans un contexte pathogène, *C. albicans* présente des facteurs de virulence multiples lui permettant d'envahir l'hôte. En particulier, ***Candida* est polymorphe, et peut notamment proliférer sous forme de levure unicellulaire, ou sous une forme multicellulaire filamenteuse appelée hyphe.**

**Les transitions entre ces phénotypes sont réversibles et régulées** par un réseau complexe de voies de signalisation **en réponse à des paramètres physico-chimiques externes**, comme le pH et la température, **ou endogènes** via des molécules de *quorum-sensing* comme le farnésol. Chaque phénotype est entretenu *via* un programme épigénétique distinct. **La morphogénèse vers la forme hyphe présente une phase transitoire d'initiation pouvant aboutir à la maintenance stable du programme hyphal** sous conditions physico-chimiques adéquates. Le mode de croissance fortement polarisé des hyphes est un facteur prédominant de virulence de *Candida*. L'extension apicale des hyphes est soutenue par des complexes de polarité qui contribuent à la biogénèse du mur, et par la pression de turgescence.

Nous avons ensuite vu que **les contraintes mécaniques sont partie prenante de l'environnement des microbes**. Nous nous sommes particulièrement focalisés sur les **contraintes compressives**. En effet, ce type de force transverse concerne tous les types cellulaires, lorsqu'ils croissent sous **confinement spatial**. Un nombre grandissant d'études montre aujourd'hui que **cette contrainte mécanique module en retour la croissance cellulaire**. Chez les levures, plusieurs mécanismes régulés permettent la survie et l'adaptation aux forces mécaniques comme la réorientation de la croissance polarisée, ou l'arrêt dans le cycle cellulaire. La compression mécanique induite par la croissance limite également des processus biologiques, comme l'expression protéique, dans un mécanisme non-spécifique d'augmentation de la densité intracellulaire.

**Plusieurs voies de transduction du signal contribuent à la réponse aux contraintes mécaniques chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae***. Ces voies sont en partie conservées chez *C. albicans*. De plus, la capacité des hyphes à réorienter leur croissance en réponse aux obstacles physiques, le thigmotropisme, suggère à quel point la composante mécanique de l'environnement joue un rôle important chez ce pathogène. Nous avons finalement proposé quelques contextes dans lesquels ***Candida* pourrait endurer des contraintes compressives *in vivo* comme les biofilms, l'inclusion dans des tissus biologiques, ou durant la phagocytose**. Enfin, **plusieurs études proposent des voies mécanosensibles potentielles chez *Candida*** comme la voie d'intégrité du mur cellulaire (*CWI*) ou la voie *Czfl*. La voie *Czfl* semble particulièrement moduler la morphologie majoritaire dans des colonies incluses au-sein d'une matrice semi-solide *in vitro*.

Cependant, **à notre connaissance, l'impact de la mécanique sur la transition entre phénotypes n'a pas encore été élucidée**. Comment *Candida albicans* intègre les forces mécaniques? Comment les paramètres physiques de l'environnement modulent le changement de phénotype

faisant de *Candida* un pathogène potentiellement mortel? Est-ce que les modifications épigénétiques potentiellement induites par la mécanique sont robustes et stables? Est-ce que la mécanique constitue finalement un paramètre à prendre en compte en tant que cible thérapeutique? Dans cette thèse nous allons tenter d'adresser quelques-unes de ces nombreuses questions.

Avant d'étudier l'impact de la mécanique sur la transition de phénotype de *C. albicans*, **nous commencerons par introduire notre approche méthodologique dans le chapitre 2.** Il constitue une **étude préliminaire en croissance libre qui décrit le taux de transition à l'échelle de la population, et la dynamique d'initiation et d'extension des hyphes en cellule-unique.** Pour cela, nous avons utilisé un environnement inductif communément décrit dans la littérature, basé sur l'addition de sérum au milieu de culture. En particulier, nous présenterons un **modèle décrivant la dynamique d'activation d'un promoteur spécifique aux hyphes.** Nous montrerons également comment la molécule de *quorum-sensing* farnésol module la transition et la maintenance vers le phénotype "hyphes". Nous reprendrons ce fil conducteur "taux d'induction, initiation et maintenance" dans la suite de ce manuscrit, et nous mettrons en perspective les résultats sous contrainte mécanique avec ceux de ce chapitre.

Dans le **troisième chapitre, nous discuterons la modulation de l'efficacité de transition levure-hyphes dans des populations confinées spatialement dans un dispositif microfluidique.** Après avoir décrit l'outil microfluidique et les paramètres physico-chimiques que nous avons utilisés, nous rappellerons comment la croissance d'une population confinée de levures développe de la pression. Nous montrerons que **l'induction d'hyphes sous confinement spatial est modulée à la fois temporellement et spatialement.** Nous proposerons un **modèle théorique réunissant la modulation du cycle cellulaire sous pression, et l'accumulation de la molécule de quorum-sensing farnésol pour décrire ce comportement.** Ces résultats nous amèneront à discuter du transport de molécules dans un poreux constitué de levures. Les limitations de ce modèle seront également discutées au regard des ajustements et prédictions que nous obtenons par rapport aux résultats expérimentaux.

Dans le **quatrième chapitre, nous reviendrons à la dynamique cellule-unique d'initiation et d'extension des hyphes sous pression induite par la croissance confinée.** Nous verrons que la force d'activation d'un promoteur spécifique aux hyphes semble compenser la limitation biophysique de la pression, tandis que la maintenance de la croissance hyphale est limitée sous pression. Nous verrons aussi que les paramètres rhéologiques d'encombrement intracellulaire varient d'un phénotype à l'autre, ce qui nous questionne sur la dépendance entre paramètres biophysiques et type cellulaire chez un même organisme.

Le cinquième **chapitre exposera des résultats préliminaires sur l'induction et la croissance hyphale sous couplage entre mécanique, advection de milieu liquide, et pH extracellulaire.** Nous discuterons comment le taux d'induction est affecté sous pH alcalin et lorsque du milieu issu du surnageant de culture cellulaire est perfusé dans le dispositif microfluidique. Nous verrons que le pH alcalin favorise fortement l'induction lorsque le milieu est renouvelé par advection, et que ce stress chimique module la force d'activation d'un promoteur spécifique aux hyphes durant l'initiation de la transition. Nous proposerons un mécanisme potentiel de transition stochastique régulée par les molécules *quorum-sensing* sécrétées.

Après une conclusion générale des chapitres présentant les résultats de ces travaux de thèse, un chapitre "**Matériel et Méthodes**" complète ce manuscrit. Nous y décrivons notamment la culture cellulaire, la fabrication et l'utilisation des outils microfluidiques et les méthodes d'analyse d'images développées.

# Chapitre 2

## Dynamique d'initiation et de maintenance hyphale en croissance libre

### 2.1 Introduction

Nous avons présenté dans l'introduction les principaux changements physico-chimiques qui favorisent la transition morphotypique levure vers hyphe. Deux phases découpent la morphogénèse, l'initiation et la maintenance. Avant d'évaluer l'impact des forces compressives sur la morphogénèse, nous nous proposons d'étudier ces deux phases dans des conditions d'induction connues de la littérature, c'est-à-dire en milieu liquide à pH neutre, comportant 20% de sérum et à 37°C.

Nous commencerons par présenter brièvement le rapporteur  $P_{HWP1} - GFP$  que nous allons utiliser tout au long de cette étude. Ensuite, nous présenterons la dynamique d'initiation analysée à l'échelle de la population, puis de la cellule, et le modèle que nous avons choisi pour décrire la dynamique d'expression du rapporteur en *cellule-unique*. Nous décrirons après cela la dynamique de maintenance de l'hyphe, et nous allons vérifier que le rapporteur que nous utilisons suit la dynamique de croissance des hyphes.

Comme nous l'avons vu dans la partie 1.2.5, *C. albicans* sécrète une molécule de *quorum-sensing* qui réprime la transition levure vers hyphe. Nous terminerons donc cette première étude par l'impact du farnésol sur le taux d'initiation d'hyphes dans la population, et la maintenance de la croissance des hyphes. Les résultats de ce chapitre sont préliminaires et nous ont permis d'interroger plusieurs hypothèses dans la suite de l'étude. Ils nous permettent de présenter les méthodologies de mesures qui seront utilisées dans la suite de cette thèse.

### 2.2 Dynamique de l'initiation sous stress inductif continu

#### 2.2.1 Présentation du rapporteur $P_{HWP1} - GFP$

Il est commun d'étudier le comportement d'un organisme au travers de l'expression de certains gènes, qui déterminent notamment le phénotype de l'individu. Une méthode classiquement employée consiste à déterminer la quantité d'ARN messagers produits au cours du temps par RTq-PCR<sup>1</sup>. L'ARN messager étant lui-même le produit de la transcription du gène, sa quantité traduit le

---

1. RTq-PCR (*Rétro-Transcription de PCR quantitative*) est une méthode particulière de PCR (réaction en chaîne par polymérase) qui permet de mesurer la quantité d'ADN contenue dans l'échantillon au cours du temps par détection de fluorescence émise par le produit de PCR.

niveau de transcription du gène. Cependant, ce type de technique nécessite de pouvoir récupérer l'échantillon de levures, ce qui est pour l'instant impossible avec le type de puces microfluidiques que nous utiliserons dans cette étude. Pour accéder à cette information, nous allons donc utiliser un rapporteur fluorescent qui nous permettra de visualiser la présence d'hyphes dans des populations denses en temps réel. Nous disposons d'une construction  $P_{HWP1} - GFP$  qui nous a été fournie par le groupe de H. Liu [278]. Cette construction génétique consiste en la fusion d'une protéine fluorescente GFP au promoteur du gène  $HWP1$ <sup>2</sup> sur l'un des deux allèles du mutant. Ainsi, la GFP est transcrite avec la même dynamique que le gène  $HWP1$ . En revanche ce type de construction ne permet pas de connaître la localisation de la protéine  $HWP1$ , la GFP ainsi produite diffuse simplement dans le cytoplasme. Nous rappelons que Hwp1 est une protéine du mur cellulaire associée aux hyphes. Elle fait partie de la famille des adhésines et participe à la virulence de *C. albicans*.

## 2.2.2 Pourcentage d'hyphes dans la population sous sérum à 37°C

Afin de déterminer l'initiation de la filamentation dans une population de cellules, nous commençons par inoculer une puce microfluidique avec la souche  $P_{HWP1} - GFP$  cultivée une nuit en milieu liquide comme décrit dans le Matériel et Méthodes. La puce est ensuite perfusée avec du milieu liquide riche contenant 20% de sérum fœtal de veau, l'enceinte contenant la puce étant thermalisée à 37°C. Le flux de milieu liquide est assuré par un contrôleur de pression afin de le renouveler durant l'expérience qui dure ici 8 heures. Des images sont prises en lumière blanche et dans le canal correspondant à la GFP (laser 488 nm) du microscope confocal toutes les 20 minutes (voir Matériel et Méthodes). Pour cette étude préliminaire et la caractérisation en *cellule-unique*, nous avons choisi d'utiliser le modèle de puce développé par Elodie Couttenier durant sa thèse [61]. En effet, après plusieurs tentatives d'expériences en plaques à puits, nous n'avons pas pu acquérir d'image exploitable de la croissance des hyphes, car celles-ci poussent souvent en hauteur et sortent de la tranche optique observée. Plutôt que d'utiliser des *Z-stacks* et risquer du photo-blanchiment et une potentielle photo-toxicité, nous avons fait le choix de confiner en hauteur les cellules dans des chambres microfluidiques pour pouvoir étudier à la fois l'initiation et la maintenance. Une image adaptée de la thèse d'Elodie Couttenier résume ce dispositif (figure 2.1), les chambres sont découpées en deux portions : une première partie de 6,5 µm de hauteur et une seconde partie plus basse de 1,5 µm de hauteur qui permet de confiner spatialement les hyphes qui ont une épaisseur moyenne de 2 µm.

Nous considérons une initiation lorsque l'intensité de fluorescence d'une levure devient supérieure à l'auto-fluorescence. Les décomptes d'induction sont déterminés manuellement par l'expérimentateur. Nous donnons un exemple d'image superposant lumière blanche et fluorescence sur la figure 2.1-B. La première correspond au temps initial et les trois levures décomptées n'ont pas encore initié d'hyphes. Après une heure, elles sont toutes les trois fluorescentes et nous pouvons voir l'émergence d'un tube germinatif de chacune d'entre-elles. Ensuite, le ratio du nombre d'inductions sur le nombre total de levures est calculé au cours du temps. Le taux d'induction d'hyphes dans la population augmente rapidement sous sérum à 37°C, pH7, et dépasse les 50% en 20 minutes environ, pour parvenir à 100% en 1 heure. Notons que ce temps correspond à la durée moyenne du cycle cellulaire de *C. albicans* qui est de 80 minutes à 30°C [51, 174] suggérant que les cellules ne se transforment pas dans n'importe quelle phase du cycle cellulaire. Cette dynamique correspond à celle observée dans d'autres études dans des conditions similaires (sérum, 37°C) [180].

---

2. HWP1 : Hyphal Wall Protein 1

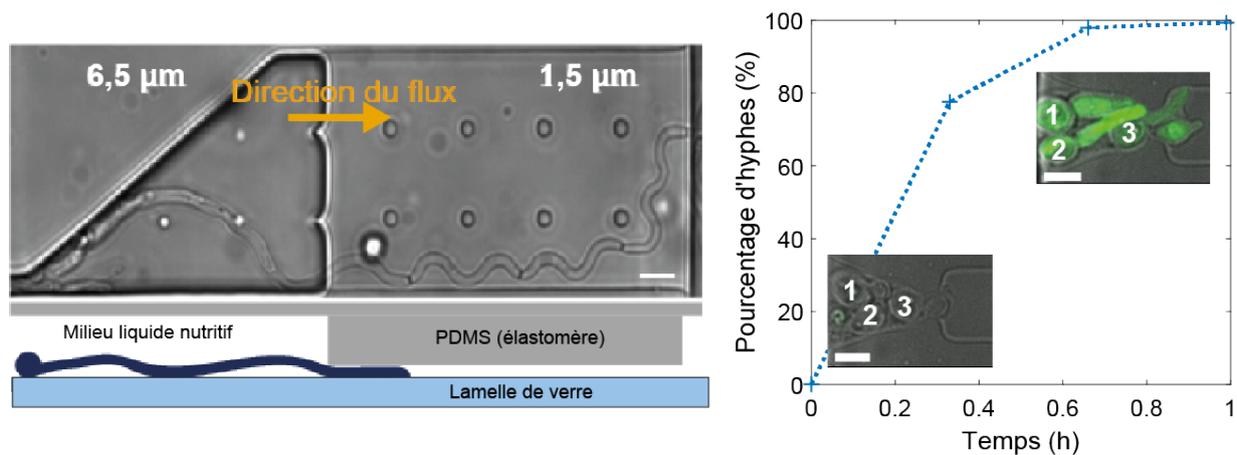


FIGURE 2.1 – (A) Vu en microscopie lumière blanche de l'une des chambres de la puce microfluidique utilisée, développée par Elodie Couttenier durant sa thèse [61]. En dessous : schéma d'une vue en coupe représentant un hyphale et les différentes hauteurs de chambres composant la puce. (B) Pourcentage d'hyphes dans la population sous sérum à 37°C au cours du temps. En-cart : exemples de levures et d'hyphes décomptés. Après une heure dans les conditions testées, toute la population est sous forme hyphale.

## 2.3 Dynamique *cellule-unique* de l'expression du rapporteur durant l'initiation

### 2.3.1 Acquisition et résultats bruts

Nous allons maintenant observer l'expression du rapporteur durant l'initiation, c'est-à-dire durant l'émergence d'un hyphale à partir d'une levure. Pour cela nous utilisons le même dispositif et les mêmes conditions présentées précédemment. Pour cette étude nous allons observer l'intensité moyenne de fluorescence en fonction du temps sur plusieurs cycles cellulaires. Un exemple type de levure de la souche  $P_{HWP1} - GFP$  produisant des hyphes est montré figure 2.2. L'intervalle de temps entre chaque prise d'image en fluorescence est toujours de 20 minutes.

Nous pouvons observer l'émergence d'un premier tube germinatif 40 minutes après l'inoculation à 37°C sous sérum (flèche bleue) suivi de la septation une heure plus tard (flèche rouge). Après un délai de 40 minutes environ, une seconde évagination est visible à 2 h 20. La cellule mère semble produire un volume important de vacuoles (masse noire dans le cytoplasme de la cellule) durant cette période, ce qui correspond aux observations de Barelle *et al.* [19, 21]. La durée moyenne entre l'apparition d'un bourgeon et la septation est d'environ une heure ici, ce qui est en accord avec les données de la littérature sur le cycle-cellulaire [51, 174]. Notons ici que chaque septation est située près de la cellule-mère, ce qui rappelle la morphologie pseudo-hyphale. Nous verrons dans la suite (Fig. 2.6) que la morphologie s'approche de celle des hyphes au fil des cycles cellulaires du filament. Nous pouvons déjà vérifier ici que l'intensité de fluorescence augmente durant la phase d'initiation.

Nous avons mesuré l'intensité moyenne de fluorescence au cours du temps pour plusieurs cellules-mères. Cette mesure est faite manuellement avec le logiciel ImageJ et l'intensité moyenne sur une portion d'aire cellulaire est extraite. Cette valeur est proportionnelle à la concentration de

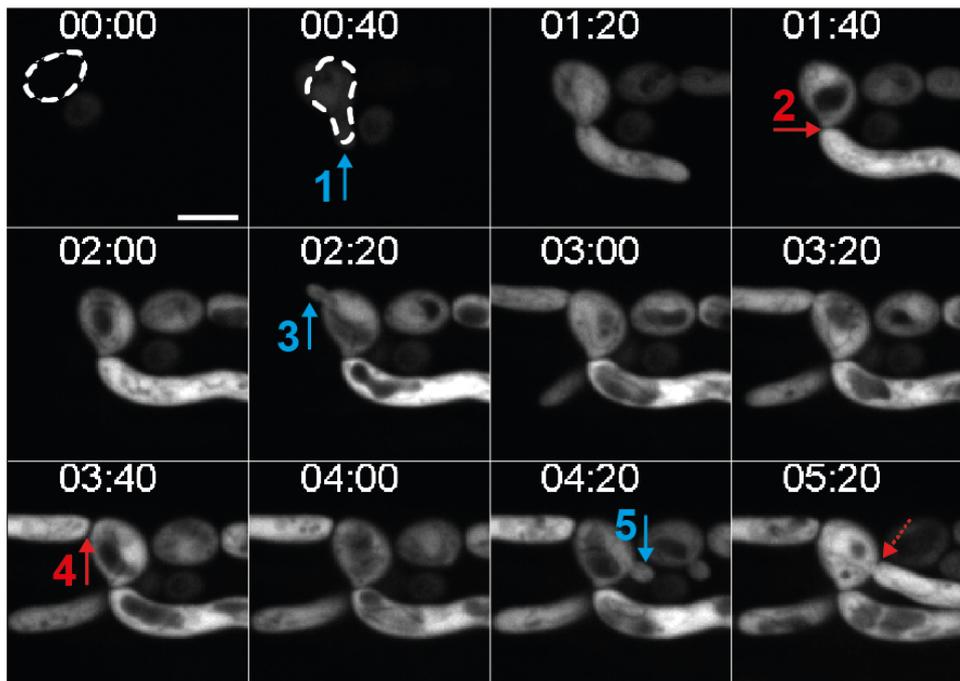


FIGURE 2.2 – Vu en microscopie confocale de la fluorescence exprimée par une levure produisant des hyphes au cours du temps. Les flèches bleues marquent l'apparition de nouveaux branchements, les rouges la septation entre cellules. Echelle 5  $\mu\text{m}$ .

protéines en  $\text{U.A.}\mu\text{m}^{-3}$  (Unité Arbitraire). Le résultat brut obtenu est présenté figure 2.3-A. Nous constatons que passée la première heure, la valeur d'intensité est très bruitée au cours du temps, et il est difficile de dégager une tendance de l'échantillon. Nous allons donc nous recentrer sur une seule cellule, celle déjà présentée (Fig. 2.2). Le résultat obtenu est présenté figure 2.3-B. Les instants correspondants à chaque septation sont indiqués en pointillés rouges, les bourgeonnements en bleu. Nous constatons que suivant la première septation à 1 h 40, l'intensité moyenne diminue jusqu'à 50% entre deux ré-entrées dans le cycle. Il semble que l'augmentation forte de la concentration de protéines dans la cellule-mère à chaque cycle coïncide avec l'émergence d'un hyphe et sa croissance, ce qui correspondrait à la production de la protéine Hwp1 durant la biosynthèse du mur.

### 2.3.2 Modèle décrivant l'expression temporaire du rapporteur suivie d'une décroissance

La concentration de protéines au cours du temps semble donc dépendre du cycle et de la croissance hyphale de chaque cellule. Cependant, les cellules ne sont pas synchronisées dans la même phase du cycle durant l'inoculation, et ces événements biologiques sont bruités à l'échelle de la population. Un autre exemple de levure produisant un hyphe (Fig. 2.4) montre que l'initiation débute à environ 1 h 20 seulement après le début de l'expérience. Nous souhaitons donc quantifier l'expression de protéines du rapporteur par cellule et non à l'échelle de la population afin d'essayer de dégager une tendance dans la suite de l'étude.

Nous avons mesuré l'intensité de fluorescence d'une dizaine de cellules du début de l'initiation. Nous nous focalisons sur la mesure à partir de 20 minutes avant l'émergence d'un hyphe

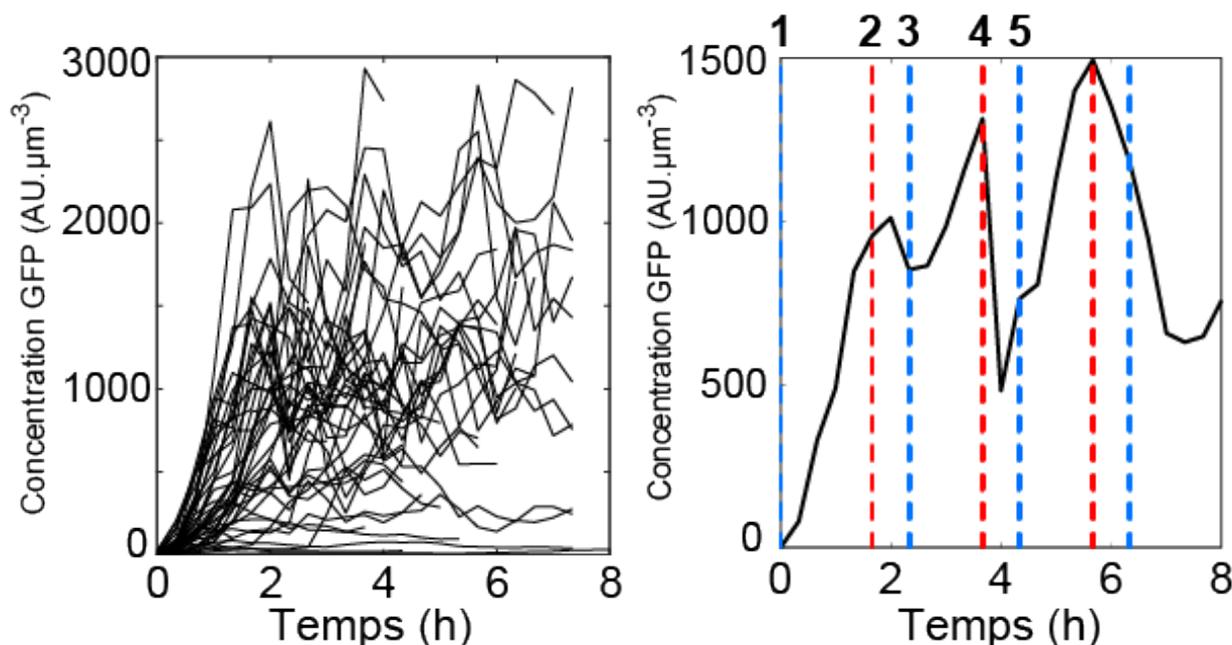


FIGURE 2.3 – (A) Intensité moyenne de fluorescence au cours du temps pour l'ensemble des levures étudiées ( $N = 49$ ). (B) Intensité moyenne de fluorescence au cours du temps obtenue à partir des images de la figure 2.2. Les septations sont notées en rouge, l'émergence de branchements en bleu.

et jusqu'à l'émergence du bourgeon suivant. Nous émettons l'hypothèse que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration en protéines fluorescentes dans le cytoplasme et nous ajustons chaque courbe en utilisant le modèle d'équations différentielles suivant :

$$\begin{cases} \dot{m} = k_{pm} \times u(t) - k_{dm} \times m \\ \dot{p} = k_{pp} \times m - k_{dp} \times p \end{cases}$$

Avec  $\mathbf{m}$  la concentration cytoplasmique d'ARN messagers transcrits et  $\mathbf{p}$  la concentration en protéines fluorescentes ( $\text{UA} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ),  $k_{pm}$  le taux de production d'ARN messagers,  $k_{dm}$  leur taux de dégradation net,  $k_{pp}$  le taux de création de protéines fluorescentes,  $k_{dp}$  leur taux de dégradation net.

Attention, les taux nets de dégradation comprennent à la fois un terme de dégradation (recyclage des protéines et ARN) mais aussi le taux de dilution car les cellules sont en croissance. Ces taux s'expriment en  $\text{h}^{-1}$ , excepté  $k_{pm}$  qui s'exprime en  $\text{UA} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Enfin,  $\mathbf{u}$  est une fonction que nous définissons comme suit :

$$\begin{cases} u(t) = 1, t \in \Delta t \\ u(t) = 0, \text{sinon} \end{cases}$$

où  $\Delta t$  est l'intervalle de temps durant laquelle les ARN messagers sont produits. Plusieurs exemples de courbes ajustées sont présentés figure 2.5. Ce modèle nous donne accès aux taux net de dégradation des ARN messagers et des protéines, à la durée de la transcription  $\Delta t$  et au taux de création effectif de protéines  $k_{p\text{-eff}} = k_{pp} \cdot k_{pm}$ . Pour faire les ajustements, nous utilisons la

fonction *fminsearch* de Matlab avec comme grandeur à minimiser la somme des écarts modèle-observations au carré (méthode des moindres carrés).

Les paramètres obtenus pour la cellule de la figure 2.4 sont indiqués en encart de la figure 2.5-B. Les valeurs médianes pour les cellules étudiées sont les suivantes :

Paramètre	Description	Valeur estimée
$k_{dm}$	Taux dégradation ARN messagers	$2,6 \pm 0,5 h^{-1}$
$k_{dp}$	Taux dégradation protéines	$1,0 \pm 0,3 h^{-1}$
$\Delta t$	Durée transcription ARN	$1,1 \pm 0,1 h$
$k_{p-eff}$	Taux production effectif protéines	$3200 \pm 2600 UA.\mu m^{-3} .h^{-2}$

Tout d'abord, nous observons que le taux de création effectif de protéines fluorescentes est très bruité et la taille de l'échantillon étudié ne permet pas encore de conclure sur ces données. La durée de transcription  $\Delta t$  est de l'ordre de l'heure et correspond à la durée du cycle cellulaire. Le taux de dégradation net d'ARN messagers correspond à un temps de demi-vie de l'ordre de 20 minutes. Cette valeur est compatible avec les temps de demi-vies observés dans d'autres études chez la levure *S. cerevisiae* à 37°C et qui sont comprises entre 3 minutes et 90 minutes [296, 243].

En revanche le taux de dégradation net de protéines est légèrement élevé par rapport au temps connu de demi-vie de la GFP qui est de l'ordre de plusieurs heures. Barelle *et al.* ont cependant évalué cette valeur chez *C. albicans* à 1,5 h à 37°C et 10 % de sérum dans une construction  $P_{PKC1}$ -GFP [20]. Nous rappelons que ce taux  $k_{dp}$  contient à la fois les termes de dilution et de dégradation. En supposant que le taux de division et le taux de croissance sont similaires chez les levures [136] une première approximation est de retrancher la valeur du taux de division. Or, nous avons observé que le temps moyen de doublement de population (durée d'un cycle cellulaire) vaut environ une heure. Le taux de doublement (ou taux de division cellulaire) vaut donc  $\log(2)/\Delta t_{cycle} = \log(2)/1 \approx 0,7 h^{-1}$ . En retranchant cette valeur au taux net de dégradation de protéines, nous obtenons alors la valeur de  $0,3 h^{-1}$ , soit un temps de demi-vie de 3 h 20 environ.

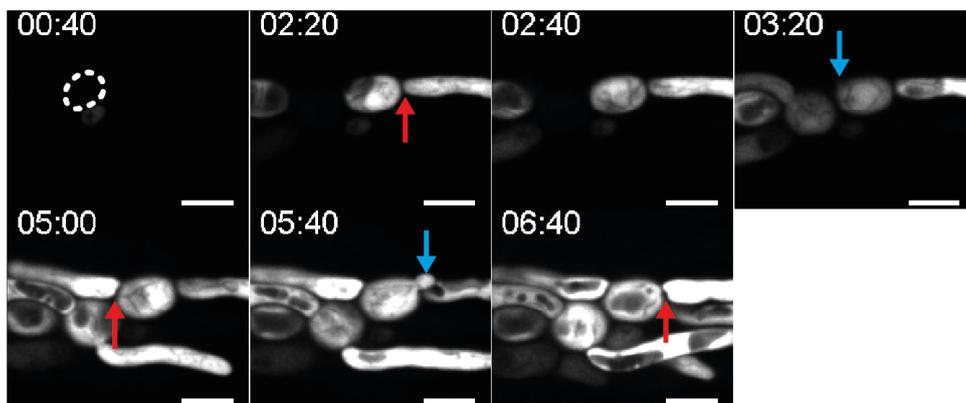


FIGURE 2.4 – Un autre exemple en microscopie confocale de la fluorescence durant l'initiation d'hyphes par une levure. Echelle 5  $\mu m$ .

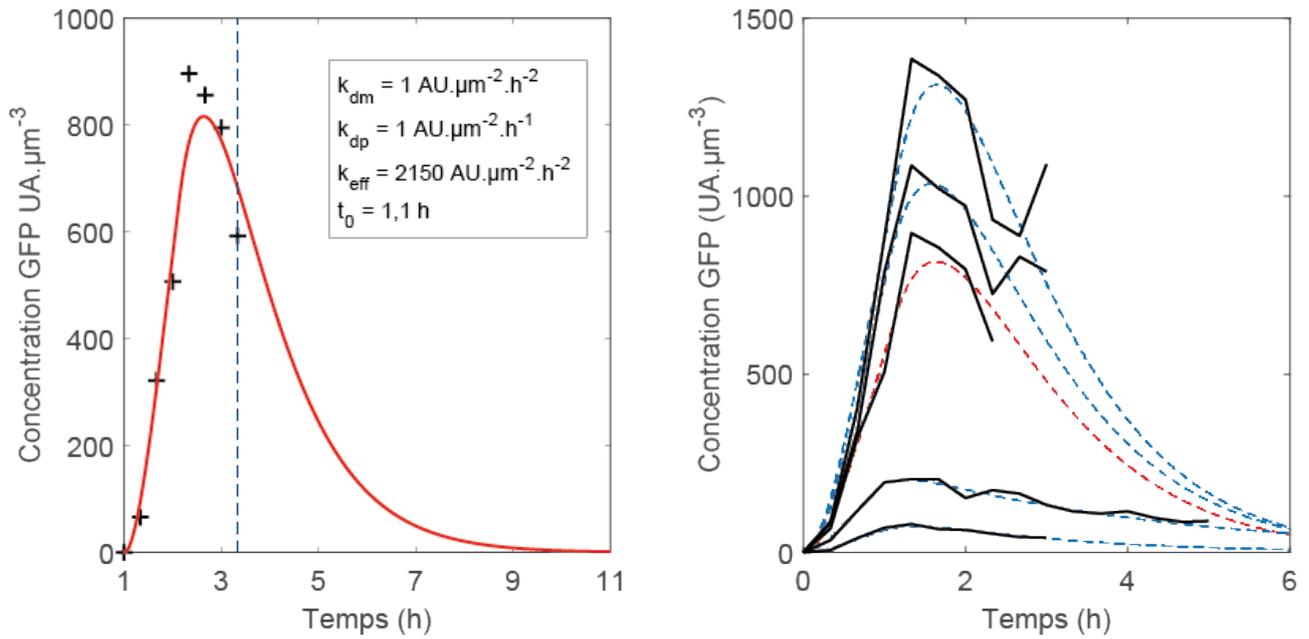


FIGURE 2.5 – (A) Exemple de courbe ajustée (en rouge) sur l'intensité mesurée ((+) en noir) à partir de la levure montrée figure 2.4. Les valeurs de paramètres obtenus sont données en encart. (B) Intensités moyennes de fluorescence au cours du temps avant l'apparition d'un nouveau branchement; en rouge les courbes ajustées par cellule à partir du modèle proposé.

## 2.4 Dynamique *cellule-unique* de l'expression du rapporteur durant la maintenance

### 2.4.1 Intensité de fluorescence apicale durant l'extension de l'hyphe

Nous nous intéressons maintenant à l'intensité de fluorescence exprimée dans chaque cellule apicale de l'hyphe, une fois que la première septation avec la cellule-mère a eu lieu. Un exemple de mesure est donné figure 2.6. Nous mesurons l'intensité moyenne sur l'ensemble de l'aire de chaque cellule apicale.

Nous pouvons voir un autre exemple (Fig. 2.7) mettant en évidence les septations (flèches rouges). La première mesure est faite sur la cellule annotée 2 à 2 h 20, et sur chaque cellule apicale qui suit, respectivement annotées 3 et 4. La variation d'aire et d'intensité moyenne de chaque cellule apicale est présentée figure 2.8-A,B en noir.

Nous remarquons que la concentration de protéines augmente globalement au fil des générations de cellules apicales. Nous allons étudier la dynamique d'expression pour chacune d'entre elles. Cependant, nous disposons d'une résolution temporelle relativement faible (20 minutes) et nous n'avons en moyenne que 5 à 6 points de mesure entre deux septations par cellule. D'autre part, nous remarquons que la courbe d'intensité de fluorescence est monotone pour certaines cellules (Fig. 2.8-B, N°2 et 4).

Pour ces raisons, nous choisissons une autre méthodologie pour étudier la maintenance, afin de ne pas sur-ajuster la courbe par cellule avec le modèle présenté dans la partie précédente. Nous allons donc calculer un taux de production net de protéines, qui comprend à la fois la création et la dégradation. Nous commençons par ajuster des régressions linéaires sur des portions de courbes

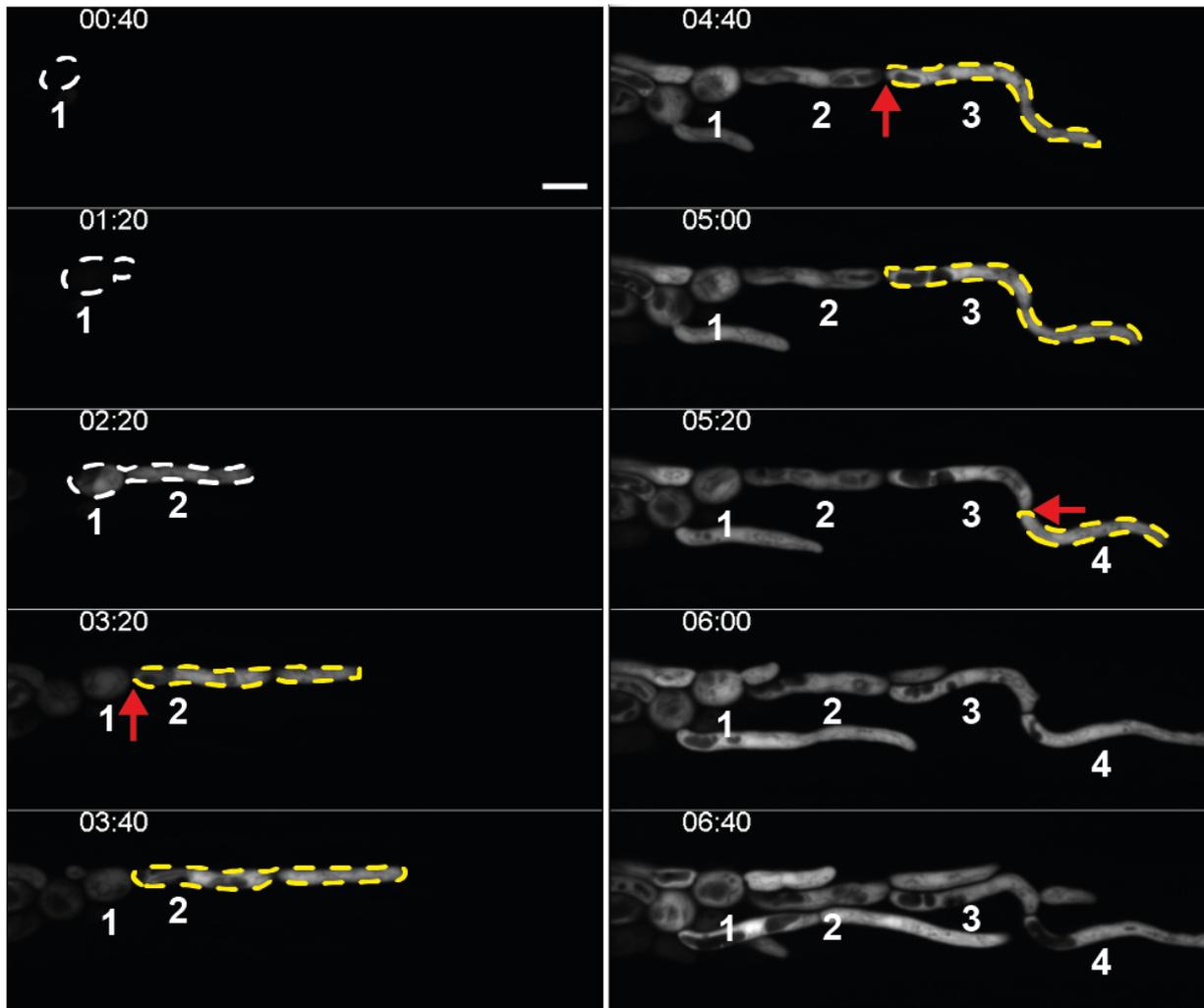


FIGURE 2.6 – Exemple d'intensité de fluorescence le long d'un hyphe sous sérum à 37°C. Les flèches marquent les septations, les flèches en pointillés indiquent un pré-septum. Les mesures d'intensité sont faites à partir de 3h20. Pour les mesures de cellules apicales, seule la zone entourée de pointillés jaunes est prise en compte. Echelle 5  $\mu\text{m}$ .

de mesures, à partir de chaque septation, en utilisant le logiciel Matlab. Chaque fonction linéaire prend la forme suivante, respectivement pour l'aire, et pour l'intensité :

$$\begin{cases} A(t) = A_0 + \frac{dA}{dt} \times (t - t_0) \\ I(t) = I_0 + \frac{dI}{dt} \times (t - t_0) \end{cases}$$

Avec  $A$  l'aire,  $I$  l'intensité;  $A_0$  et  $I_0$  sont respectivement l'aire et l'intensité initiale pour l'intervalle de temps considéré. La variation d'aire  $\frac{dA}{dt}$  correspond à la vitesse d'expansion en  $\mu\text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$  et la variation d'intensité  $\frac{dI}{dt}$  est proportionnelle à une variation de concentration en  $\text{UA} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Notons que seuls les intervalles de temps pour lesquels l'aire de la cellule augmente de façon monotone, ou est constante entre deux septations sont pris en compte (Fig. 2.8-A). Les ajustements linéaires sont effectués sur les mêmes intervalles de temps pour l'intensité de fluorescence (Fig. 2.8-B). Seuls les ajustements d'aires ayant un R-carré supérieur à 0,9 sont considérés dans la suite de l'étude.

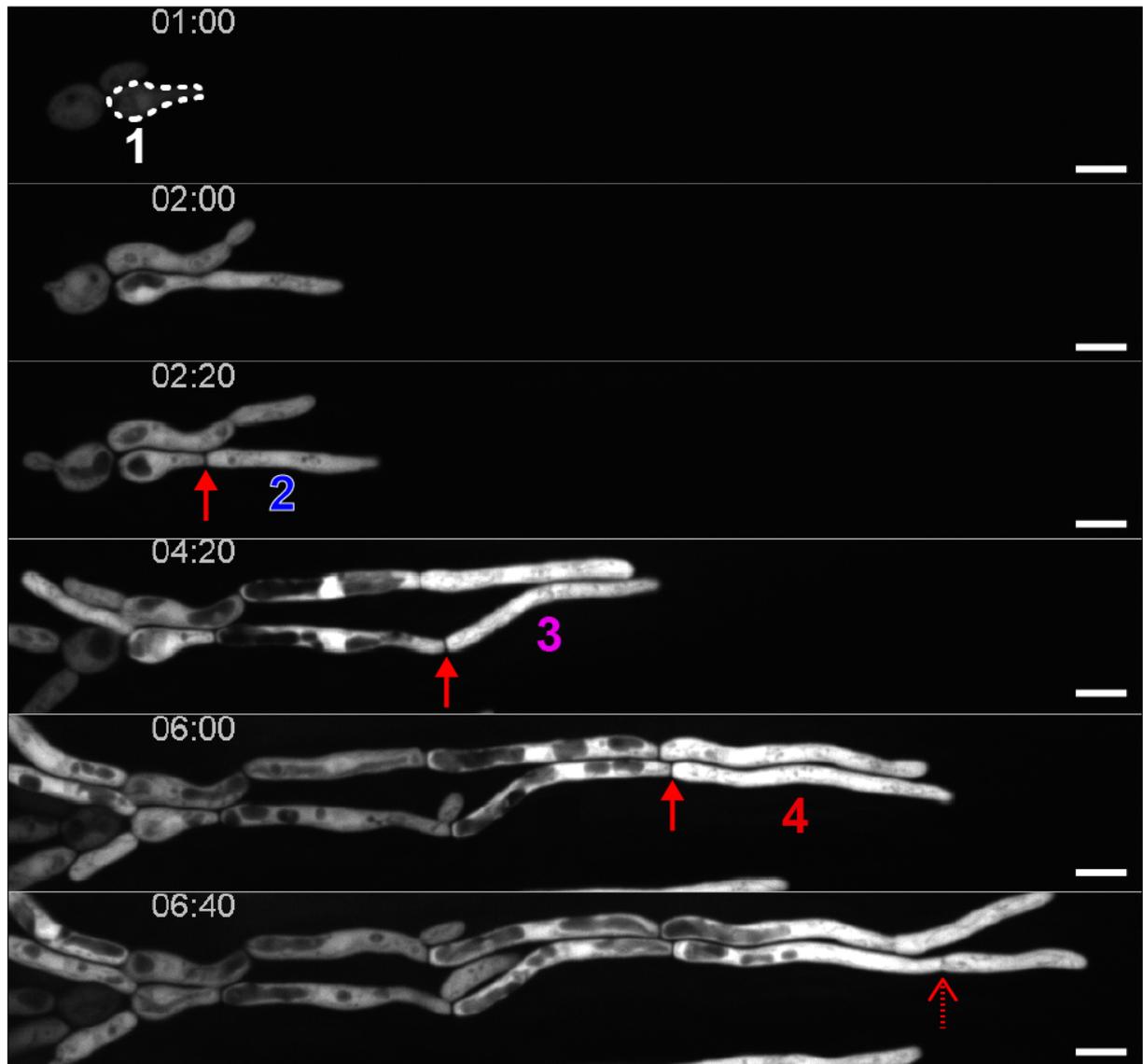


FIGURE 2.7 – Autre exemple d'intensité de fluorescence le long d'un hyphe sous sérum à 37°C. Les flèches marquent les septations, la flèche en pointillés indique un pré-septum. Échelle 5 µm.

### 2.4.2 L'expression du rapporteur est corrélée à la vitesse d'expansion de l'hyphe

Chaque régression linéaire donne accès aux pentes qui indiquent respectivement la variation d'aire et d'intensité par unité de temps. Nous pouvons alors tracer la variation d'intensité en fonction de la vitesse d'expansion (Fig.2.9-A). Il n'y a pas de corrélation significative entre ces deux grandeurs et plusieurs valeurs de variation d'intensité sont négatives. Nous pouvons voir un exemple de pente négative sur la régression linéaire Fig.2.8-B (N°4) entre 6 h et 6 h 40. Comme nous avons accès à la vitesse d'expansion, nous proposons de prendre en compte la dilution des protéines avec la croissance de chaque cellule apicale. Pour cela nous repartons de la définition de la concentration (ici noté  $p$ ) et du taux de croissance :

$$\frac{1}{p} \frac{dp}{dt} = \frac{1}{n_p} \frac{dn_p}{dt} - \frac{1}{V_c} \frac{dV_c}{dt} \rightarrow \frac{dp}{dt} = \frac{1}{V_c} \frac{dn_p}{dt} - k_{\text{croissance}} \times p$$

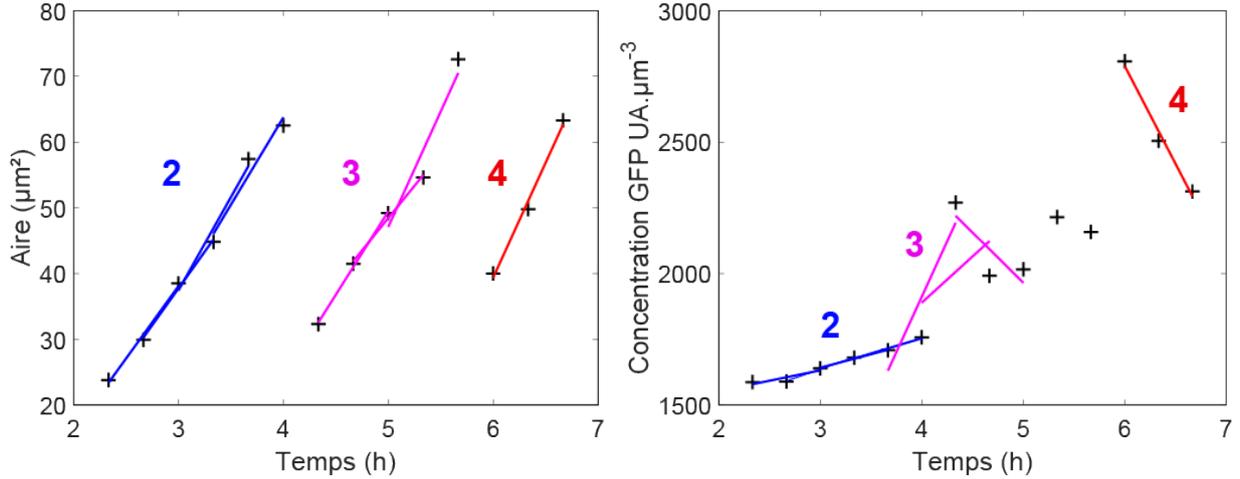


FIGURE 2.8 – (A) Variation de l'aire de la cellule apicale de l'hyphé au cours du temps correspond à la figure 2.7. Les valeurs mesurées sont en noir (+). Chaque régression linéaire est ajustée sur trois points entre deux septations (en couleur). Chaque couleur correspond à une cellule. Seules les régressions linéaires avec un  $R^2$  supérieur à 0.90 sont conservées. (B) Variation de l'intensité moyenne de fluorescence de chaque cellule apicale au cours du temps (en noir) et les régressions linéaires associées (en couleur).

Avec  $p$  la concentration en protéines ( $\text{mol} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ),  $V_c$  le volume cellulaire ( $\mu\text{m}^3$ ),  $n_p$  le nombre de protéines (mol), et  $k_{\text{croissance}}$  le taux de croissance. La grandeur  $\frac{dp}{dt}$  (ou  $\dot{p}$ ) correspond à la pente issue de la régression linéaire décrite plus haut. Nous recalculons donc chaque valeur de taux de production net de protéines comme suit :

$$k_{p\text{-net}} = \frac{dp}{dt} + k_{\text{croissance}} \times p_0 \rightarrow k_{p\text{-net}} = \frac{dI}{dt} + \frac{\frac{dA}{dt}}{A_0} \times I_0$$

Pour chaque intervalle de temps nous considérons que  $\frac{dp}{dt}$  correspond à la pente obtenue  $\frac{dI}{dt}$ ,  $p_0$  correspond à la valeur de concentration initiale sur l'intervalle étudié  $I_0$ , et  $k_{\text{croissance}}$  au taux d'augmentation de l'aire mesurée soit  $\frac{\frac{dA}{dt}}{A_0}$ . Nous notons  $k_{p\text{-net}}$  le taux de production net de protéines qui comporte un terme de production et de dégradation (recyclage des protéines). Les mesures expérimentales ne permettent pas de discriminer ces deux termes ici.

Une fois corrigé par le taux de dilution, nous observons que le taux de production net augmente avec la vitesse d'expansion des cellules apicales d'hyphes (Fig. 2.9. Nous vérifions ainsi que le rapporteur utilisé suit la dynamique de croissance hyphale. La valeur médiane du taux de production effectif est de  $1400 \pm 67 \text{ UA} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  et nous estimons la vitesse d'expansion à  $27,9 \pm 0,9 \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , ce qui est cohérent avec les valeurs connues dans la littérature [234, 106].

Revenons au modèle proposé dans le cas de l'initiation afin de vérifier la cohérence des valeurs obtenues pour les cellules-apicales et pour les cellules-mères. Nous proposons dans le cas de la cellule apicale que la transcription est toujours active. La fonction  $u(t)$  qui décrit l'état d'activation du promoteur de *HWP1* devient donc une constante que nous fixons à 1. Le modèle proposé dans la partie 2.3.2 peut alors s'écrire comme suit :

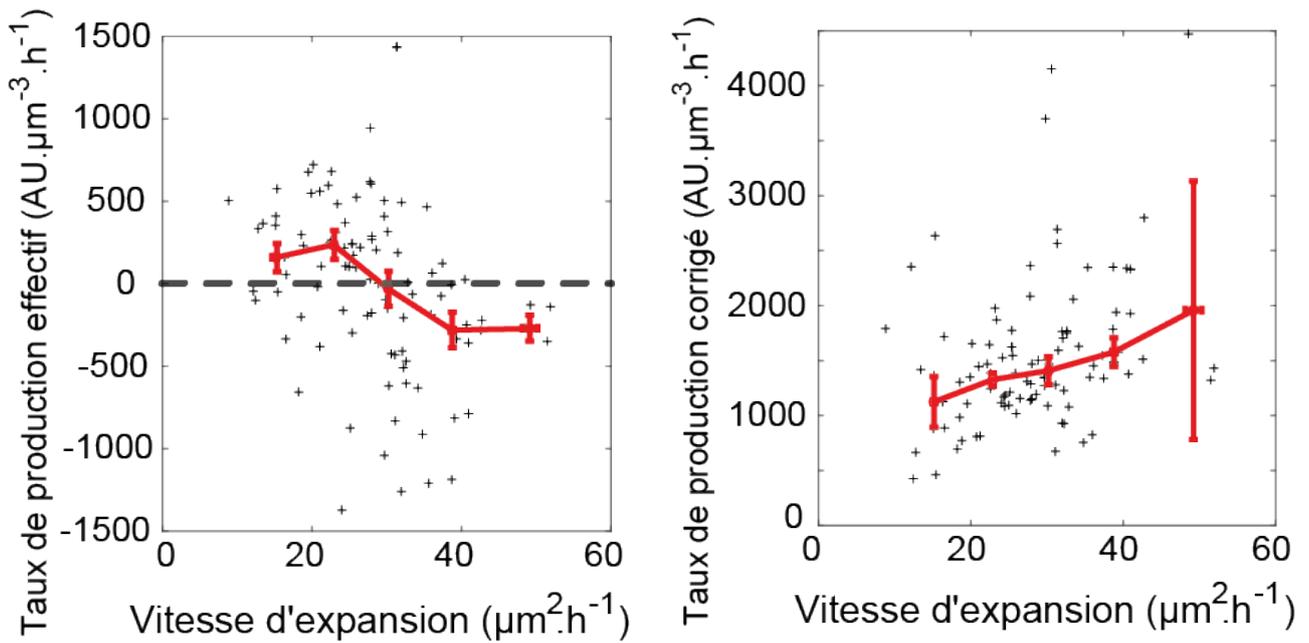


FIGURE 2.9 – (A) Taux de production mesuré en fonction du taux d’extension. Chaque point représente la valeur obtenue pour une régression linéaire. Seules les régressions linéaires sur les courbes d’aires avec un  $R^2 \geq 0,9$  sont présentées. ( $N_{\text{cellules}}=49$ ). (B) Taux de production effectif corrigé par le facteur de dilution. La production effective de protéines augmente avec la vitesse d’extension de la cellule apicale de l’hyphe.

$$\begin{cases} \dot{m} = k_{pm}m - k_{dm} \times m \\ \dot{p} = k_{pp} \times m - k_{dp} \times p \end{cases}$$

Durant la cytokinèse, les concentrations initiales  $\mathbf{p}_0$  et  $\mathbf{m}_0$ , respectivement de protéines, et d’ARN messagers, sont transmises à la nouvelle cellule apicale.

Nous avons déduit dans la partie précédente que le temps de demi-vie des ARN messagers est de l’ordre de la vingtaines de minutes. Nous supposons donc que le temps caractéristique du régime transitoire de  $\mathbf{m}(t)$  est négligeable par rapport au temps caractéristique de  $\mathbf{p}(t)$  et que c’est la quantité de protéines qui devient rapidement limitante par rapport à la quantité d’ARN messagers, à la résolution temporelle dont nous disposons. Nous nous plaçons donc dans un régime stationnaire pour les ARN messagers et leur concentration devient une constante du temps telle que  $m(t) \approx m_0 \approx m_\infty$

De plus, nous avons ajusté la variation d’intensité de fluorescence sur des intervalles de temps d’une heure, or le temps de demi-vie des protéines est d’environ 3 h. Nous supposons donc négligeable la contribution de l’exponentielle  $e^{-k_{dp}t}$  contenue dans la fonction  $\mathbf{p}(t)$  et nous approximations ce régime exponentiel par un régime linéaire. Les fonctions  $\mathbf{m}$  et  $\mathbf{p}$  se simplifient finalement comme suit :

$$\begin{cases} m_\infty = \frac{k_{pm}}{k_{dm}} \\ p = p_0 + \left( \frac{k_{pm} \cdot k_{pp}}{k_{dm}} - p_0 \cdot k_{dp} \right) \cdot t \end{cases}$$

Où  $k_{pm} \cdot k_{pp}$  correspond au taux de création effectif de protéines  $k_{p\text{-eff}}$  déterminé précédemment dans le cas des cellules-mères. Nous avons aussi défini le taux de production net  $k_{p\text{-net}}$  pour les cellules-apicales comme :

$$k_{p\text{-net}} = \frac{dp}{dt} + k_{\text{croissance}} \times p_0$$

or pour les cellules-mères, nous avons la relation suivante :

$$\frac{dp}{dt} = \frac{k_{pm} \cdot k_{pp}}{k_{dm}} - p_0 \cdot k_{dp}$$

avec  $k_{dp}$  comprenant un terme de destruction de protéines, et de dilution lui-même proportionnel à  $k_{\text{croissance}}$ . Par identification nous obtenons :

$$k_{p\text{-net}} = \frac{k_{p\text{-eff}}}{k_{dm}} - (k_{dp} - k_{\text{croissance}}) \cdot p_0$$

En recalculant ainsi le taux de production net obtenu pour les cellules-mères durant la phase d'initiation, nous obtenons la valeur de  $\sim 1000 \text{ UA} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  ce qui est du même ordre de grandeur que la valeur de  $1400 \text{ UA} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  obtenue pour les hyphes.

## 2.5 Effet du farnésol sur l'initiation et la maintenance sous sérum à 37°C

### 2.5.1 Le farnésol réprime l'initiation hyphale dans la population

Dans les chapitres suivants de ce manuscrit, nous allons étudier le comportement de *C. albicans* dans des populations très denses. Ces populations seront inoculées dans des puces microfluidiques afin d'assurer le renouvellement du milieu de culture. Cependant, nous nous sommes interrogé sur la potentielle accumulation de molécules sécrétées dans ces conditions de fortes densités cellulaires, et particulièrement de farnésol. Dans l'optique de calibrer l'impact potentiel du farnésol sur la morphogénèse dans notre système, nous avons inoculé la souche  $P_{HWPI} - GFP$  dans des puits contenant du milieu à 20% de sérum à 37°C supplémenté en farnésol. Nous avons testé différentes concentrations : 0, 1, 10 et 100  $\mu\text{M}$  afin de déterminer s'il existe une dose seuil réprimant complètement l'initiation ou si l'effet varie linéairement sur la gamme de concentrations de farnésol explorée.

Pour commencer, nous avons observé que la présence de farnésol retarde l'émergence de tubes germinatifs et l'expression de *HWPI*, particulièrement lorsque la dose dépasse les 10  $\mu\text{M}$  (Fig.2.10-A). Ces données sont compatibles avec l'étude de Kebaara *et al.* [145] qui ont également observé que 20  $\mu\text{M}$  farnésol atténue d'un facteur 30 le niveau d'ARN messagers de *HWPI* à 80 minutes et retarde son expression par rapport au contrôle sans farnésol.

Nous notons que la dynamique d'induction du contrôle sans farnésol semble également plus lente que celle testée en puce microfluidique. Outre la reproductibilité expérimentale et le bruit biologique, cela pourrait être expliqué par une accumulation plus importante de farnésol dans les puits. Dans la puce microfluidique, le farnésol est continuellement rincé, prévenant son accumulation, nous y reviendrons dans le chapitre suivant. Cet effet du rinçage du farnésol sécrété sur la morphologie de *C. albicans* a également été observé par Polke *et al.*[232]. Il serait intéressant de

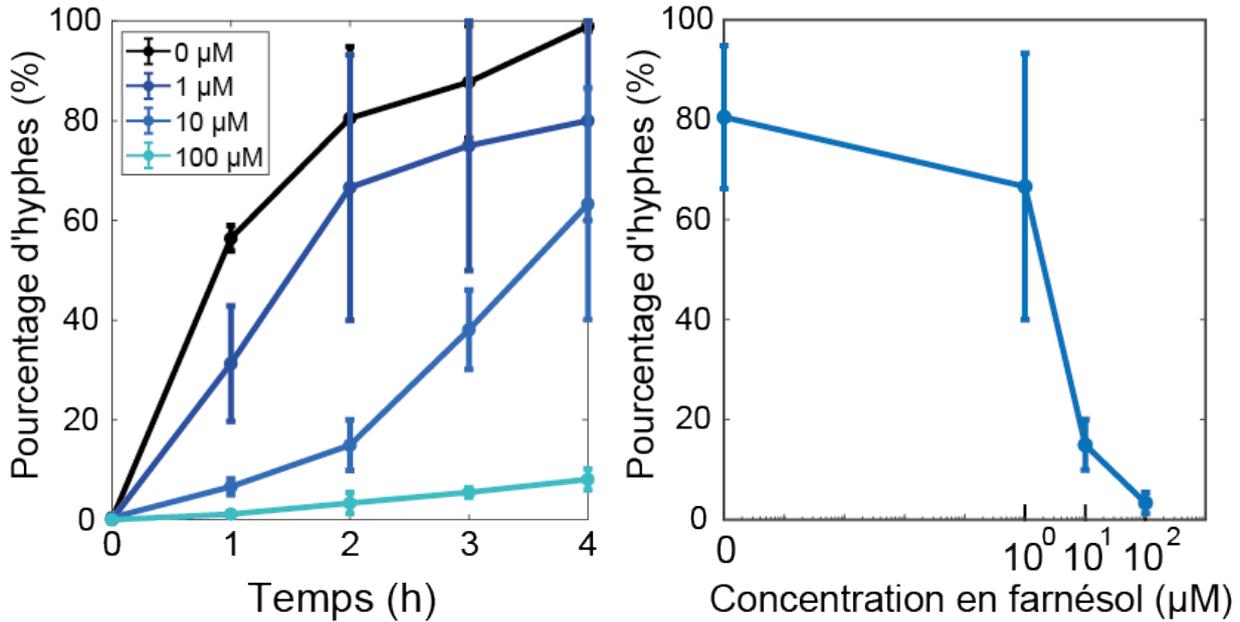


FIGURE 2.10 – (A) Pourcentage d'hyphes dans la population au cours du temps sous sérum à 37°C, en présence de différentes concentrations de farnésol pendant 4 h en puit. Ce pourcentage correspond au nombre de colonies présentant des d'hyphes divisé par le nombre total de colonies visibles à l'image au cours du temps. Le décompte est fait manuellement. **B** Proportion d'hyphes dans la population en fonction de la concentration en farnésol 2 h après l'inoculation dans le milieu testé.

développer une puce microfluidique ayant la même fonction mais qui permette d'imager simultanément plusieurs conditions chimiques.

Le taux de filamentation à 2 h sous sérum à 37°C diminue rapidement avec la dose de farnésol. La dose seuil (moins de 50% d'inductions) semble située entre 1 et 10 μM de farnésol pour cette durée d'incubation (Fig. 2.10-B). Cette grandeur est compatible avec la littérature [87, 203] sachant que la présence de sérum limite l'activité inhibitrice du farnésol comme expliqué partie 1.2.5.

## 2.5.2 Le farnésol ralentit la production de Hwp1 durant l'expansion hyphale

Nous avons également étudié l'impact de la présence de 100 μM de farnésol sur la dynamique de maintenance, c'est-à-dire sur la relation entre le taux de production net de protéines fluorescentes, et le taux de croissance, comme dans la partie 2.4.2. Pour cela nous avons inoculé des cellules sous 20% sérum à 37°C dans la puce, et pris des images durant une durée correspondant à trois cycles cellulaires (environ 4 h). Ensuite, nous avons changé le milieu par un autre contenant toujours du sérum, additionné de 100 μM de farnésol. La première partie de l'expérience, constituant le contrôle, n'est malheureusement pas exploitable à cause d'une dérive de la platine du microscope. Nous avons donc comparé ces données avec celles de l'expérience présentée dans la partie précédente 2.3.2 qui constitue ici le contrôle pour l'instant. Ces résultats sont donc préliminaires.

Nous observons que le taux de production net diminue légèrement dans les deux heures qui suivent l'addition de 100 μM de farnésol par rapport à la première condition ( $p$ -value  $\sim 10^{-16}$ ), et que la dynamique de production ralentit.

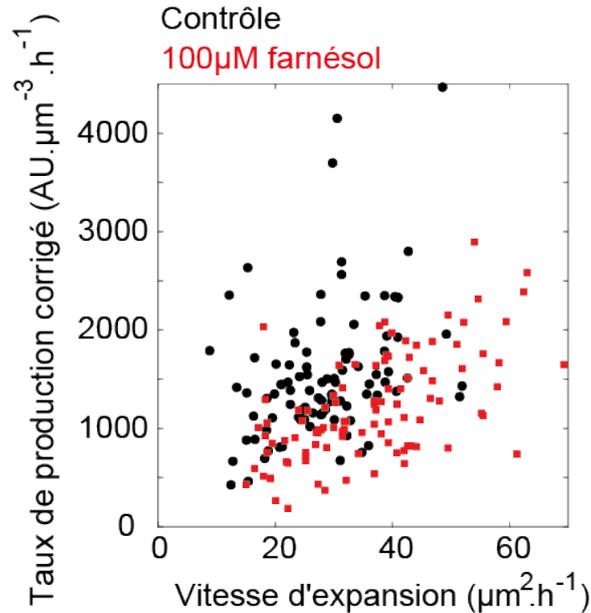


FIGURE 2.11 – Taux de production de protéines corrigé en fonction de la vitesse d'expansion. En noir, la condition contrôle, en rouge la condition après l'addition de farnésol à 100  $\mu\text{M}$ . A noter que les deux jeux de données proviennent d'expériences différentes.

Davis *et al.* ont observé que l'intensité moyenne de fluorescence exprimée par des mutants *hwp1::GFP* est similaire dans la condition contrôle et en présence de farnésol à 40  $\mu\text{M}$  après 5 h [69]. Si la dynamique que nous obtenons est confirmée par des répliques d'expérience, cela peut signifier que l'impact du farnésol sur la maintenance dépend peut-être de sa concentration dans l'environnement extracellulaire.

## 2.6 Conclusion et perspectives

### 2.6.1 Conclusion

Dans ce premier chapitre nous avons observé que la construction  $P_{HWP1} - GFP$  est un rapporteur de l'initiation et de la croissance hyphale. Nous avons étudié la morphogénèse dans des conditions très favorables à l'induction, c'est-à-dire en milieu liquide à pH 7, 20% de sérum, et 37°C. Nous avons vu que la part d'hyphes dans la population atteint rapidement 100% dès la première heure suivant l'inoculation lorsque le farnésol est rincé.

Nous nous sommes ensuite intéressé à l'expression du rapporteur à l'échelle de la cellule unique, via l'intensité de fluorescence, et avons montré que celle-ci semble osciller avec le cycle cellulaire. Nous avons utilisé un modèle d'équations différentielles pour décrire la dynamique d'expression de protéines issues du rapporteur sur un cycle-cellulaire. Ce modèle nous a permis d'évaluer les taux de production et de dégradation durant la phase d'initiation ainsi que la fenêtre de transcription dont la durée est de l'ordre d'un cycle-cellulaire.

Ensuite, nous avons observé que le niveau d'expression du rapporteur augmente avec la croissance de la cellule apicale de l'hyphes. Nous proposons que la transcription d'ARN messagers à partir du gène *HWP1* est en régime stationnaire dans ce cas et que le promoteur de *HWP1* est toujours actif au sein de la cellule apicale de l'hyphes. Les paramètres obtenus à partir du modèle

proposé pour les cellules apicales et pour les cellules-mères durant l'initiation sont du même ordre de grandeur, suggérant la cohérence du système proposé.

Enfin nous avons vu que le farnésol retarde l'initiation et diminue significativement le niveau d'expression du gène associé au hyphes *HWP1* lorsque la concentration dépasse les 10  $\mu\text{M}$  sous sérum à 37°C. Le farnésol (100  $\mu\text{M}$ ) semble également ralentir la dynamique de production de Hwp1 durant la maintenance.

## 2.6.2 Perspectives

### Rôle des vacuoles dans la maintenance

Durant ces expériences nous avons pu observer la fluorescence moyenne sur l'aire cellulaire le long d'un hyphe. Nous avons également fait ces mesures pour les cellules subapicales, par exemple pour l'hyphe de la figure 2.7. Chaque cellule subapicale est numérotée selon l'ordre d'apparition sur l'image. En traçant la concentration moyenne de ces cellules au cours du temps sur un même graphe (Fig. 2.12-A) nous remarquons que la cellule apicale fille est toujours plus concentrée en moyenne que la mère juste après leur septation. Il apparaît cependant que la mère contient également un volume important de vacuoles. Nous avons donc effectué des mesures de concentration sur des portions de cellules dépourvues de vacuoles (Fig. 2.12-B). Nous constatons alors que les intensités des cellules mères et filles sont égales à chaque septation. Ce phénomène nous interroge sur le rôle des vacuoles dans la dynamique de maintenance de la croissance hyphale. Comme évoqué dans l'introduction, ces organites jouent en effet un rôle important de recyclage des protéines et participent au maintien de l'homéostasie intracellulaire. Nous avons déjà évoqué cet aspect dans la partie 1.3.1 de l'introduction d'après l'étude de Barelle *et al.* [21]. Les résultats préliminaires que nous obtenons pourraient indiquer que les vacuoles participent à l'augmentation de la concentration du cytosol durant la phase de croissance jusqu'à la septation. Il serait intéressant d'étudier l'impact du volume vacuolaire sur la densité intracellulaire et l'éventuel lien avec la régulation du cycle et de la croissance.

### Etude de la dynamique d'expression du rapporteur durant un stress temporaire

Nous avons estimé dans cette étude les taux de production et dégradation protéique sous l'effet d'un stress continu stimulant la croissance hyphale. Il serait également intéressant d'étudier les phases d'initiation et de maintenance sous un stimulus chimique temporaire. Par exemple nous envisageons de perfuser une puce microfluidique avec du sérum, à pH 7 et 37°C pendant 0,5 à 3 h avant de rincer avec du milieu à pH 5,5 sans sérum. En effet, nous avons vu dans l'introduction que l'initiation constitue une fenêtre d'opportunité durant laquelle la croissance hyphale s'enclenche. Cette étude nous permettrait de mieux appréhender les phénomènes observés sous compression mécanique.

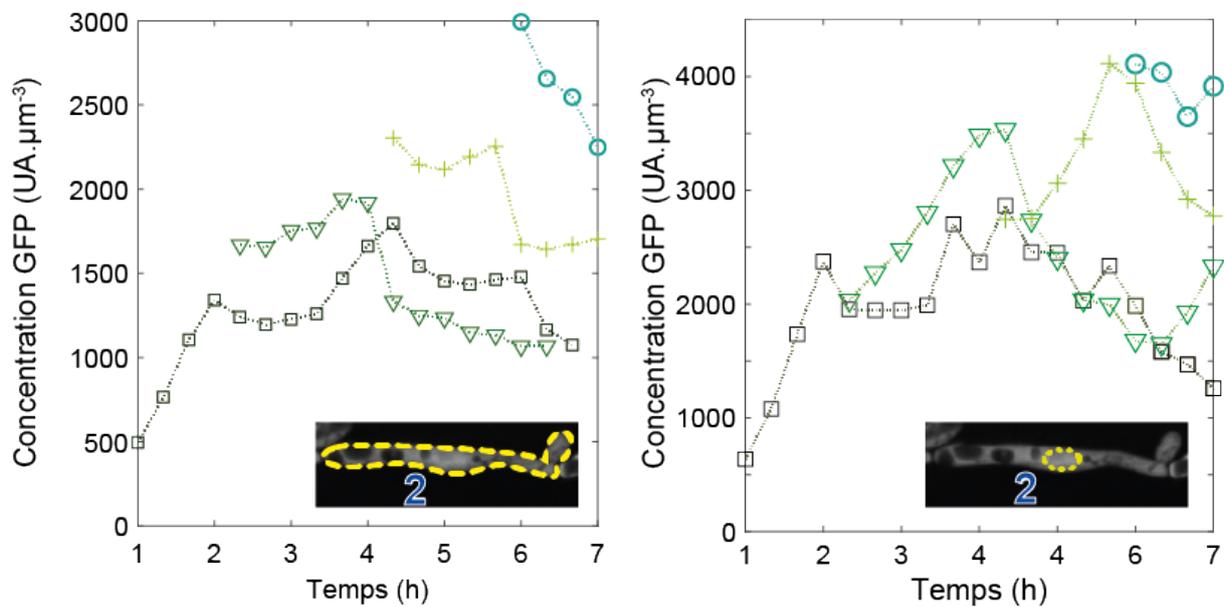


FIGURE 2.12 – Intensité de fluorescence, proportionnelle à la concentration moyenne de protéines au cours du temps, tracée par cellule subapicale et sur plusieurs cycles. (A) L'aire de mesure de l'intensité correspond à l'ensemble de chaque cellule. Si la cellule bourgeonne, celui-ci est pris en compte. Encart, exemple de mesure pour la cellule subapicale N°2 de l'image 2.7, délimitation en pointillés. (B) L'intensité de fluorescence moyenne n'est mesurée que sur une portion de cellule, en évitant les vacuoles visibles (encart, exemple de mesure en pointillés sur la même cellule).

## Chapitre 3

# Impact de la pression de croissance sur la probabilité d'initiation hyphale

Le chapitre précédent nous a permis d'introduire les notions d'initiation et de maintenance de la croissance hyphale, ainsi que les méthodes d'analyses que nous avons mises en place pour les caractériser. En utilisant des paramètres physico-chimiques (20% sérum, 37°C) très favorables à la transition levure-vers-hyphe, nous avons observé que la proportion d'hyphes dans la population atteint les 100% une heure après l'exposition continue à ce stimulus.

En ajoutant du farnésol exogène en différentes concentrations initiales, nous avons vérifié que cette molécule de *quorum-sensing* retarde les nouvelles transitions levure-hyphe dans la population. Le farnésol semble donc limiter l'**efficacité de transition** levure-vers-hyphe en présence de sérum à 37°C, comme nous l'avons vu dans l'introduction. Dans ce chapitre, nous allons maintenant étudier l'**impact de contraintes mécaniques sur l'efficacité de transition levure-hyphe**. Dans la suite, nous nous référerons à cette notion sous le terme de "**probabilité d'induction**".

Nous commencerons par présenter le principe du dispositif microfluidique développé par Delarue *et al.* [73], permettant de confiner une population de levures et d'étudier des contraintes mécaniques de compression induites par la croissance, dans un environnement physico-chimique défini. Nous expliquerons nos choix de paramètres physico-chimiques limitants pour la probabilité d'induction (température, composition du milieu). Nous rappellerons aussi ce qu'est la pression induite par la croissance sous confinement (présentée dans la partie 1.4).

Nous avons observé que la majorité des inductions d'hyphes advient dans l'heure qui suit l'arrivée à confluence de la population confinée, sous faible pression (de l'ordre de la dizaine à la centaine de kPa). La probabilité d'induction sous pression est modulée à la fois dans le temps et dans l'espace dans notre système microfluidique, et nous articulons la suite de ce chapitre autour de ces deux axes.

Nous proposons que le taux d'induction soit principalement modulé par la dynamique d'accumulation de farnésol endogène<sup>1</sup> avec l'augmentation de la densité de la population de cellules dans notre système microfluidique. Nous présenterons deux expériences qui tendent à confirmer cette hypothèse.

Nous proposons un modèle à une dimension de diffusion-advection-source en milieu poreux, qui décrit qualitativement ce phénomène. Nous proposons de plus que l'induction d'hyphes dépend de la possibilité de réentrer dans le cycle cellulaire sous pression de croissance. Nous verrons comment ce modèle peut être calibré pour prédire la probabilité spatiale et temporelle d'induction dans notre système, et quelles sont ses limitations.

---

1. Sécrété par les cellules.

## 3.1 Méthode expérimentale pour l'application de contraintes mécaniques sur les cellules

Nous allons commencer ce chapitre en introduisant brièvement le dispositif microfluidique utilisé, le contexte physico-chimique de l'étude et comment la prolifération des cellules confinées implique le développement de forces compressives mesurables.

### 3.1.1 Principe du dispositif microfluidique et choix des paramètres physico-chimiques

Le but de ce projet est de mettre en lumière l'impact de contraintes mécaniques sur la transition levure vers hyphe chez *C. albicans*. Nous avons donc trois principaux besoins méthodologiques :

- application et mesure d'une contrainte mécanique,
- maîtrise des autres paramètres chimiques et physiques,
- accès à l'information d'état morphotypique (levure ou hyphe) des cellules *C. albicans*.

Notre choix s'est donc porté vers des puces microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS). Ces dispositifs sont aujourd'hui très utilisés pour l'étude d'objets biologiques variés, qu'ils soient unicellulaires (bactéries, levures, cellules animales) ou complexes et multicellulaires (plantes, champignons, nématodes, poissons). En plus de leur compatibilité avec la culture cellulaire, les puces microfluidiques en PDMS sur verre permettent d'appliquer et mesurer des contraintes mécaniques sur les cellules, car le PDMS est un matériau élastique transparent.

Nous avons déjà évoqué plusieurs géométries de puces développées pour étudier l'impact de contraintes mécaniques sur la physiologie cellulaire en introduction (partie 1.4). Pour ce projet, nous avons utilisé les dispositifs développés par Delarue *et al.* [76] qui permettent la prolifération de populations de levures sous confinement spatial. La géométrie, la fabrication et l'utilisation de ces puces sont détaillées dans les Matériels et Méthodes.

Brièvement, ces puces comportent une série de 32 chambres en parallèle, reliées à des canaux de circulation du milieu nutritif via d'autres canaux d'épaisseur nanométrique (section  $0,5 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ) pour confiner les cellules. Après l'inoculation des cellules dans les chambres, le milieu circule tout au long de l'expérience au travers de ces nanocanaux, répartis des deux côtés de chaque chambre (Fig. 3.1, flèches bleues).

Pour tenter de discriminer l'effet de la mécanique des autres stimuli de l'environnement favorisant la transition levure vers hyphe, nous nous sommes placés dans des conditions limitantes pour cette transition. Pour cela nous avons utilisé du milieu de culture riche en glucose, en azote et en acides aminés (milieu synthétique complet à 2% de glucose, abrégé par SCD<sup>2</sup>). Nous n'ajoutons aucun facteur chimique favorable à l'induction à ce milieu (sérum, N-acétylglucosamine...). En revanche, nous avons ajusté le pH de ce milieu avec un tampon, à pH 5,5. Cette valeur de pH est en effet limitante pour la transition levure vers hyphe, comme évoqué en introduction (partie

---

2. SCD : *Synthetic Complete medium Dextrose*, milieu de culture microbiologique classiquement utilisé pour les levures. Il comprend tous les acides aminés essentiels, une source d'azote, et une source de carbone (dextrose ou glucose).

1.2.3). De plus nous maintenons la puce microfluidique à 30°C durant ces expériences. Nous n'appliquons pas la température correspondant à l'intérieur de l'hôte humain (37°C). En effet, l'élévation de la température est un paramètre favorisant fortement l'initiation hyphale ce que nous souhaitons éviter (voir partie 1.2.2 de l'introduction). Finalement, la puce en PDMS est perméable à l'air environnant et nous ne modulons pas les taux d'oxygène et de dioxyde de carbone présents naturellement dans l'incubateur.

Afin de limiter la variation de ces paramètres physico-chimiques en début d'expérience, la température, le pH et la composition du milieu nutritif sont identiques durant la culture cellulaire. Enfin, pour limiter l'effet de "taille d'inoculation" et d'altération du cycle cellulaire modulant l'induction hyphale, nous utilisons des cultures cellulaires en phase exponentielle dont la densité optique est comprise entre 0,1 et 0,2 et nous évitons les cultures en phase stationnaire (voir introduction parties 1.2.5 et 1.3.1).

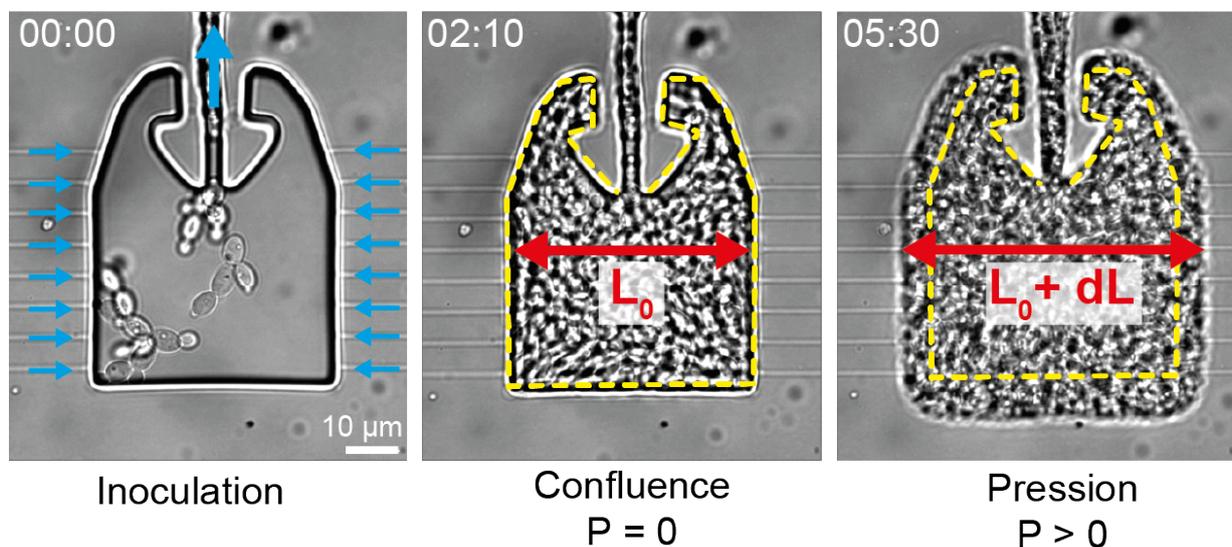


FIGURE 3.1 – Géométrie de l'une des 32 chambres composant la puce microfluidique observée en microscopie en champ clair. La puce est imagée après l'inoculation de quelques cellules au début de l'expérience (à gauche). Le milieu de culture est perfusé dans la chambre au travers de nanocanaux (flèches bleues). Les cellules prolifèrent en croissance libre jusqu'à remplir l'espace, la population arrive alors à confluence (image centrale). La population développe progressivement de la pression et déforme les parois de PDMS de la chambre (image de droite). La variation de la largeur de la chambre ( $\Delta L = L_0 + dL$ ) permet de déduire la valeur de cette pression au cours du temps.

### 3.1.2 Développement de pression induite par la croissance de cellules sous confinement

Une fois introduite dans la chambre microfluidique, la population initiale de cellules (environ une dizaine par chambre) y prolifère et remplit progressivement l'espace libre. Après environ 4 à 7 heures, la chambre est pleine (voir figure 3.1), la population a atteint la confluence et occupe tout l'espace libre. A partir de ce moment, la densité de la population augmente encore avec la prolifération, et la croissance des cellules génère progressivement de la pression sur leur environnement.

**Cette pression n'est donc pas appliquée, mais développée par les cellules spatialement confinées. Elle augmente avec le même temps caractéristique que leur croissance.** Cette configuration récapitule qualitativement le confinement spatial que pourrait rencontrer *C. albicans* dans les environnements *in vivo*, de géométries et de rigidités variées.

La pression développée par la croissance cellulaire déforme progressivement les parois en PDMS de la chambre. Le PDMS étant élastique, nous accédons à la valeur de pression en mesurant la largeur de la chambre visible en microscopie en champ clair au cours du temps (Fig. 3.1, à droite). La déformation est proportionnelle à la pression et nous ajustons le facteur de conversion par des mesures de calibration (détaillées dans la partie Matériel et Méthodes). La figure 3.2 montre qu'en moyenne, la pression induite par la croissance atteint  $\sim 500$  kPa environ trois-quatre heures après l'arrivée à confluence. Nous pouvons observer que la dynamique avec laquelle cette pression augmente ralentit progressivement au cours du temps. Nous pouvons voir que ce ralentissement est également visible pour l'accroissement du nombre de cellules à l'origine de cette pression (Fig. 3.2-A).

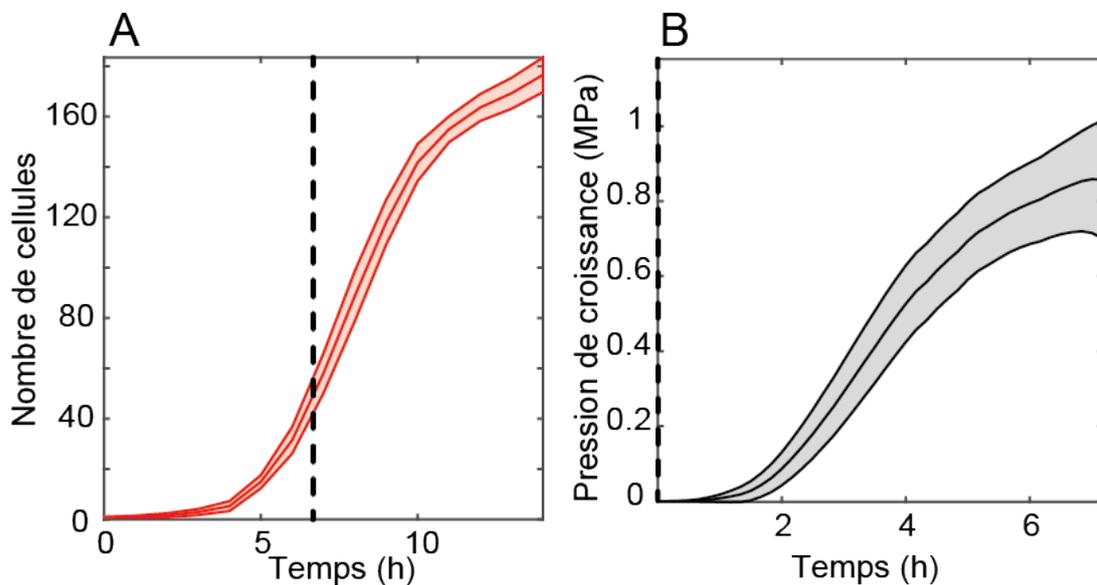


FIGURE 3.2 – (A) Nombre de cellules dans les chambres au cours du temps (décompté manuellement pour quatre chambres et une seule expérience, la segmentation automatique n'a pas encore été mise en place). Médiane et erreur type. La ligne en pointillés marque l'instant moyen d'arrivée à confluence. (B) Pression induite par la croissance des cellules confinées dans les chambres à partir de la confluence. Le temps en abscisse est initialisé au moment d'arrivée à confluence pour chaque chambre. Médiane et déviation standard.

### 3.2 La pression induite par la croissance module l'initiation d'hyphes chez *C. albicans*

Nous venons de voir comment la prolifération de *C. albicans* sous confinement spatial développe de la pression. Nous allons maintenant discuter la modulation de l'induction d'hyphes dans ce système et présenter notre méthodologie de mesure.

### 3.2.1 Observation des inductions hyphales dans la puce microfluidique

Pour cette étude, nous utilisons la construction  $P_{HWP1}$ -GFP présentée dans le chapitre précédent, afin de localiser l'induction d'hyphes dans la population dense. Nous observons de manière robuste qu'une partie de la population exprime le rapporteur de croissance hyphale sous confinement comme montré dans l'exemple type (Fig. 3.4, à gauche). Nous remarquons que ces inductions débutent en quasi-totalité après l'arrivée à confluence de la chambre. Cela suggère un stress inductif en lien avec des contraintes mécaniques et non dû aux paramètres physico-chimiques utilisés.

Une observation découlant directement du design de notre expérience vient renforcer cette hypothèse. En effet, nous inoculons chaque chambre avec un nombre variable de cellules, entre deux et une dizaine. Les chambres parviennent donc à confluence après des durées différentes, variant parfois de plusieurs heures selon ce nombre initial. Or, nous avons observé les premières inductions lorsque les chambres parviennent à confluence, indépendamment du temps d'arrivée à cette confluence. Il est donc raisonnable, pour les conditions physico-chimiques utilisées, d'écarter l'impact du rinçage du milieu et du stress lié à l'inoculation au tout début de l'expérience. Nous reviendrons sur ce point dans la suite du manuscrit, Chapitre 5.

Nous avons décompté manuellement chaque **nouvelle** induction visible au plan focal dans les chambres au cours du temps à l'aide du logiciel ImageJ. Nous ne comptons donc pas chaque cellule qui est sous forme d'hyphe, mais chaque primo-induction. **Nous souhaitons en effet distinguer la notion d'initiation (ou de transition), de la notion de maintenance (ou d'héritabilité) de la morphogénèse.**

Nous avons également enregistré la position de chaque induction le long de la largeur de chaque chambre. Les chambres étant symétriques avec des canaux d'arrivée de milieu de chaque côté, nous normalisons les positions des inductions par rapport à ces entrées, comme illustré figure 3.3. La position le long de cet axe est nulle lorsque la cellule qui induit se situe au bord de la chambre, autrement dit au plus près des canaux de renouvellement de milieu. Elle vaut  $\sim 25 \mu\text{m}$  lorsque l'induction est détectée au centre de la chambre.

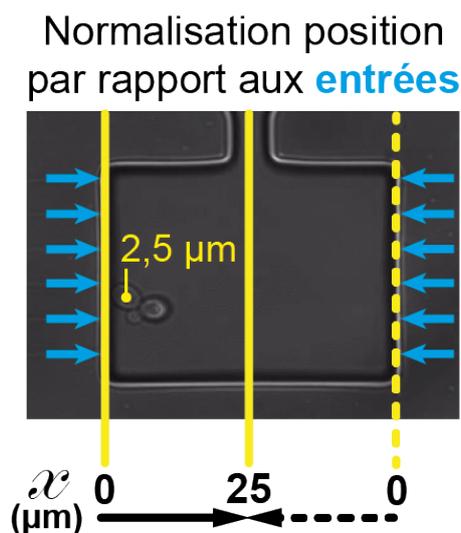


FIGURE 3.3 – Renormalisation des positions des cellules par rapport à la distance aux entrées de renouvellement de milieu le long de la largeur de chaque chambres (centre à  $x = 25 \mu\text{m}$ ). Par exemple, la cellule annotée est à  $\sim 2,5 \mu\text{m}$  du bord.

Ensuite nous traçons ce décompte dans le temps et dans l'espace des inductions sous la forme d'un histogramme à deux dimensions. Un axe "spatial" présente les inductions par rapport à la distance aux entrées de milieu, et un axe "temporel" présente les inductions par rapport à l'instant d'arrivée à confluence. Notre objectif à terme est de pouvoir comparer différentes conditions physico-chimiques entre elles en utilisant ces puces. Nous souhaitons donc normaliser le décompte des inductions en une probabilité (ou pourcentage) comme présenté dans le cas du sérum, 37°C dans le chapitre précédent (Fig. 2.1-B).

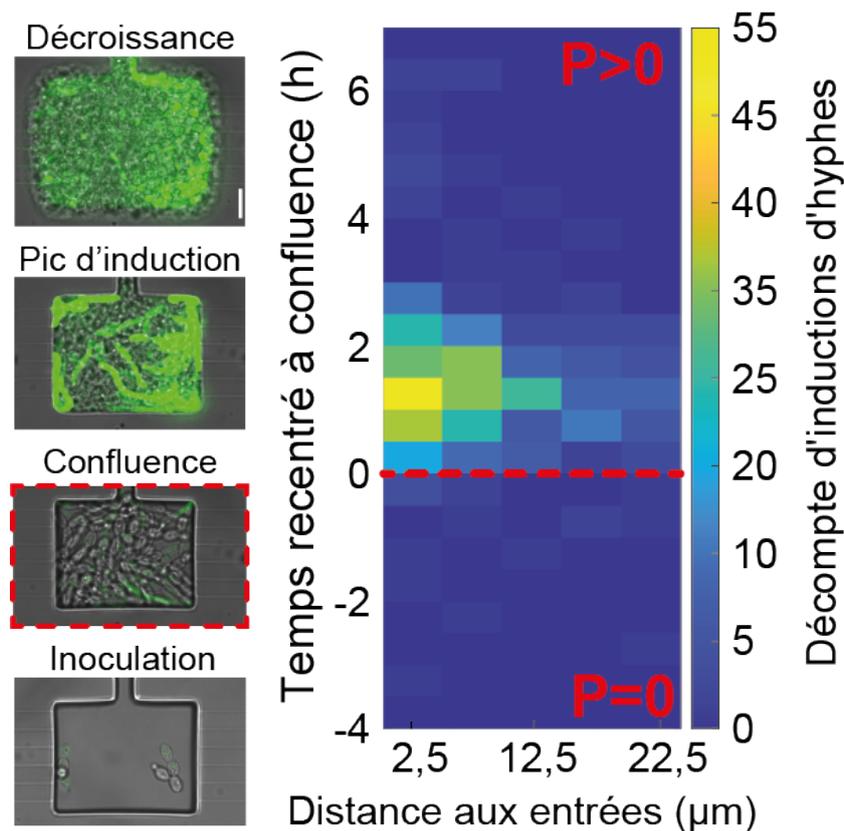


FIGURE 3.4 – Décompte des inductions d'hyphes par rapport au moment d'arrivée à confluence (ordonnée de l'historgramme) et par rapport à la distance aux entrées de renouvellement de milieu (abscisse de l'historgramme). La ligne en pointillés marque l'instant d'arrivée à confluence, lorsque la pression de croissance commence à augmenter. Cet histogramme cumule 5 expériences indépendantes, pour un total de 61 chambres et 486 inductions décomptées. **A gauche**, une chambre typique illustrant les différents instants correspondant à l'historgramme (le temps est croissant du bas vers le haut). Notons que sur la dernière image (en haut), la fluorescence est encore visible sous forte pression, mais très peu de nouvelles inductions ont été en réalité détectées, c'est l'effet de "maintenance".

### 3.2.2 Normalisation du nombre d'inductions : taux d'induction spatio-temporel

Dans l'idéal, il faudrait normaliser le décompte d'inductions par unité de temps et d'espace, par le nombre de cellules non-induites par unité de temps et d'espace, pour obtenir une densité spatio-temporelle d'induction. Cependant, nous n'avons pas encore directement accès au nombre exact de cellules observées par chambre pour toutes les expériences réalisées. Comme indiqué

dans la partie précédente, nous n'avons décompté le nombre de cellules en fonction de la pression que pour quelques chambres et cette estimation n'est pas encore automatisée. Il faudrait, pour faciliter cette mesure, une construction avec un double marquage  $P_{HWP1}$ -GFP et nucléaire (par exemple un marquage des histones). Cela permettrait de pouvoir déterminer cette grandeur de façon plus systématique. **Pour cette étude, nous allons supposer qu'à partir de la confluence, le nombre total de cellules est similaire au cours du temps dans chaque chambre.** En première approche, nous avons donc renormalisé la cumulée temporelle du nombre d'inductions par le nombre total de cellules estimé figure 3.2.

Nous calculons cette cumulée temporelle pour différentes positions le long de l'axe spatial (distance aux canaux) sur des tranches de  $2,5 \mu\text{m}$  de large<sup>3</sup>. Ensuite, nous divisons la cumulée temporelle d'inductions obtenue par tranche, par le nombre total de cellules contenues dans cette tranche<sup>4</sup>, pour obtenir un taux d'induction spatio-temporel (Fig. 3.5).

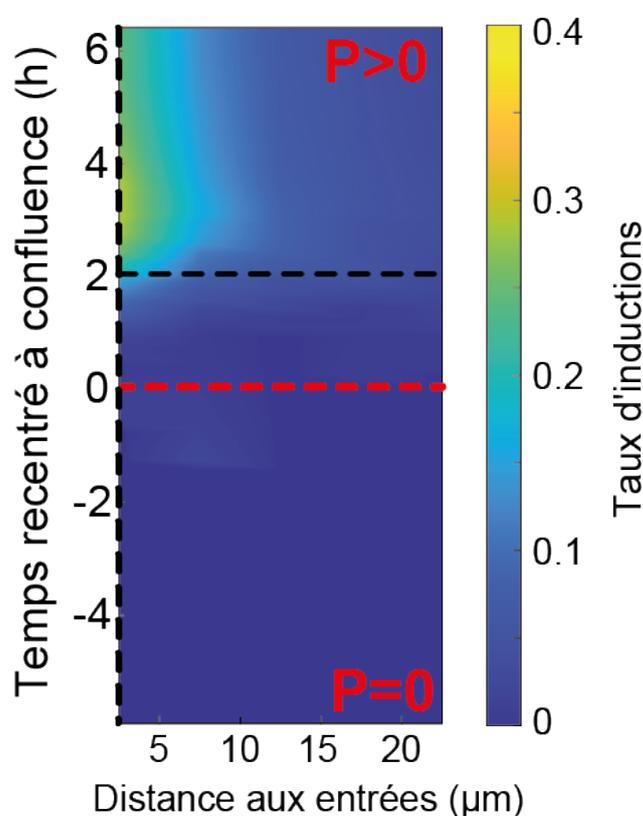


FIGURE 3.5 – Taux d'induction d'hyphes dans les chambres microfluidiques. La ligne en pointillés rouges marque l'instant d'arrivée à confluence, lorsque la croissance des cellules développe progressivement de la pression. Les lignes en pointillés noirs indiquent les sections temporelles et spatiales utilisées pour construire les graphes figure 3.6. **Attention**, la couleur de chaque unité spatio-temporelle pour laquelle le taux d'induction est évalué ( $2,5 \mu\text{m}$  de large et pas de 10 minutes) est interpolée ici, pour lisser l'affichage des résultats.

Nous remarquons que la plupart des inductions d'hyphes adviennent près des entrées de mi-

3. Les positions sur lesquelles sont centrées ces "tranches" et pour lesquelles la cumulée temporelle est calculée sont :  $2,5 \mu\text{m}$ ,  $7,5 \mu\text{m}$ ,  $12,5 \mu\text{m}$ ,  $17,5 \mu\text{m}$  et  $22,5 \mu\text{m}$ .

4. Chaque "tranche" représente une surface de  $2,5 \times 40 \mu\text{m}$ , soit un vingtième de la surface totale de la chambre ( $50 \times 40 \mu\text{m}$ ). Nous divisons donc par vingt le nombre total de cellules  $N(t)$  pour obtenir le nombre "par tranche".

lieu et dans une fenêtre temporelle d'environ 3 h, ce qui correspond à une gamme de pressions inférieures à  $\sim 400$  kPa. Nous avons compté au total 486 inductions jusqu'à 7 h après confluence, dans 61 chambres. A partir du décompte de cellules (Fig. 3.2) nous estimons que 7 h après confluence, le nombre total de cellules par chambre est d'environ 170. Nous en déduisons un **pourcentage d'induction total** d'environ 4% dans les conditions étudiées, toutes valeurs de pressions et toutes positions confondues. Cette sous-partie de population qui induit est très faible, nous avons observé que 100% des cellules induisent après environ 1 h sous sérum à 37°C.

Pour mieux visualiser l'évolution spatio-temporelle de ce taux d'induction, nous avons tracé la variation temporelle à 2,5  $\mu\text{m}$  du bord (Fig. 3.6-A) et la variation spatiale 2 h après confluence (Fig. 3.6-B). Tout d'abord, nous observons que la proportion de cellules qui induisent diminue avec la distance aux canaux de renouvellement de milieu (Fig. 3.6-B). Elle est quasi-nulle ( $\sim 3\%$ ) au centre de la chambre à 2 h après confluence. Ensuite, nous remarquons que le taux d'induction au bord (Fig. 3.6-A) augmente après la confluence et atteint les 25% au bout de 3 h. Cette proportion n'atteint donc jamais les 100%, même près du bord où le taux spatial d'inductions est maximal. De plus, le taux d'induction diminue lentement après 3 h, il n'y a plus de nouvelle induction décomptée, tandis que le nombre total de cellules continue lui d'augmenter.

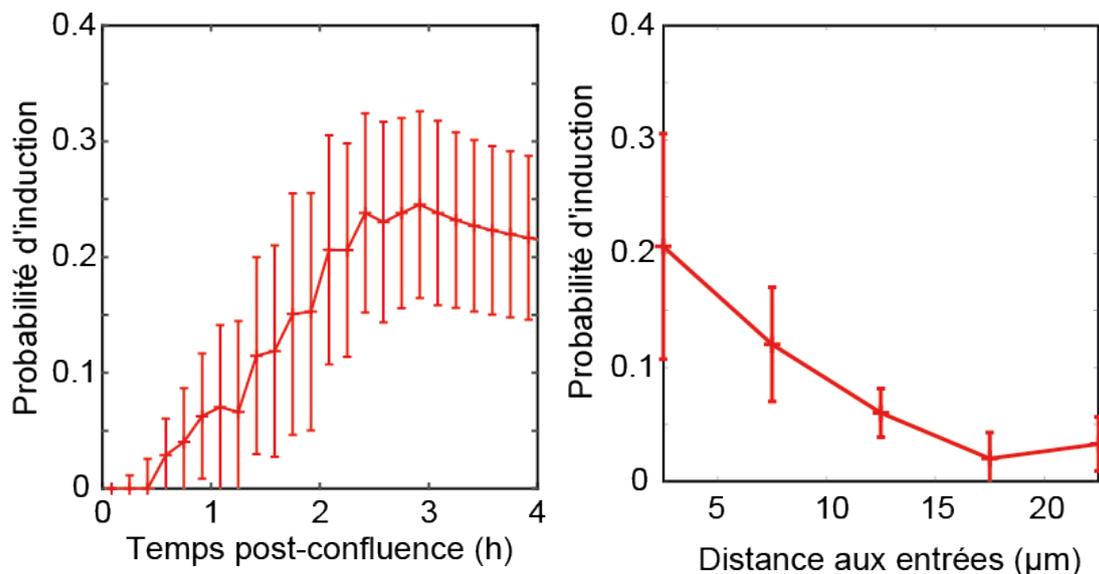


FIGURE 3.6 – (A) Taux d'induction en fonction du temps à partir de la confluence et à 2,5  $\mu\text{m}$  du bord. (B) Taux d'induction en fonction de la distance aux canaux d'arrivée de milieu, 2 h après l'arrivée à confluence

Nous avons émis plusieurs hypothèses pouvant expliquer ces observations :

- nous supposons l'existence d'une part d'un stimulus "activateur" d'induction, et d'un stimulus "répresseur",
- nous supposons que le stimulus d'activation est l'arrivée à confluence de la chambre,
- nous supposons que les cellules doivent avoir passé  $G_1$  sous le stimulus pour intégrer le signal puis induire,
- nous supposons l'existence d'un gradient chimique favorisant les inductions près du bord des chambres.

Afin d'évaluer ces hypothèses, et plus particulièrement l'impact d'un éventuel gradient chimique dans la population confinée, nous avons mené deux expériences.

### 3.3 Le farnésol comme candidat dans la modulation du taux d'induction sous pression de croissance

#### 3.3.1 Effet de la vitesse de rinçage de milieu sur le taux d'induction

Tout d'abord, nous avons augmenté la pression en entrée du système de perfusion afin d'augmenter le débit de rinçage de milieu dans les chambres. Pour la condition contrôle, nous utilisons une pression en entrée de 120 kPa. Les chambres de  $40 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  sont desservies de chaque côté par 6 canaux fluidiques de dimensions  $0,5 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$  (hauteur  $\times$  largeur  $\times$  longueur). La résistance hydrodynamique de chaque canal est de  $\sim 4,5 \times 10^{18} \text{ Pa.s.m}^{-3}$ . La hauteur de l'ensemble des autres canaux de circulation du milieu étant vingt fois supérieure, nous négligeons la résistance du reste du système fluidique, estimée à  $\sim 1 \times 10^{15} \text{ Pa.s.m}^{-3}$ , par rapport à celles des canaux nanométriques. Nous avons estimé le débit desservi ( $Q_{\text{in}}$ ) de chaque côté des chambres à  $\sim 0,16 \text{ nL/s}$ . Pour la condition test, nous avons augmenté la pression en entrée à 300 kPa, le débit s'élève alors à  $0,40 \text{ nL/s}$ . Le taux **global** d'inductions (tout temps et toutes positions confondus) augmente de 38% à 300kPa (Fig 3.7).

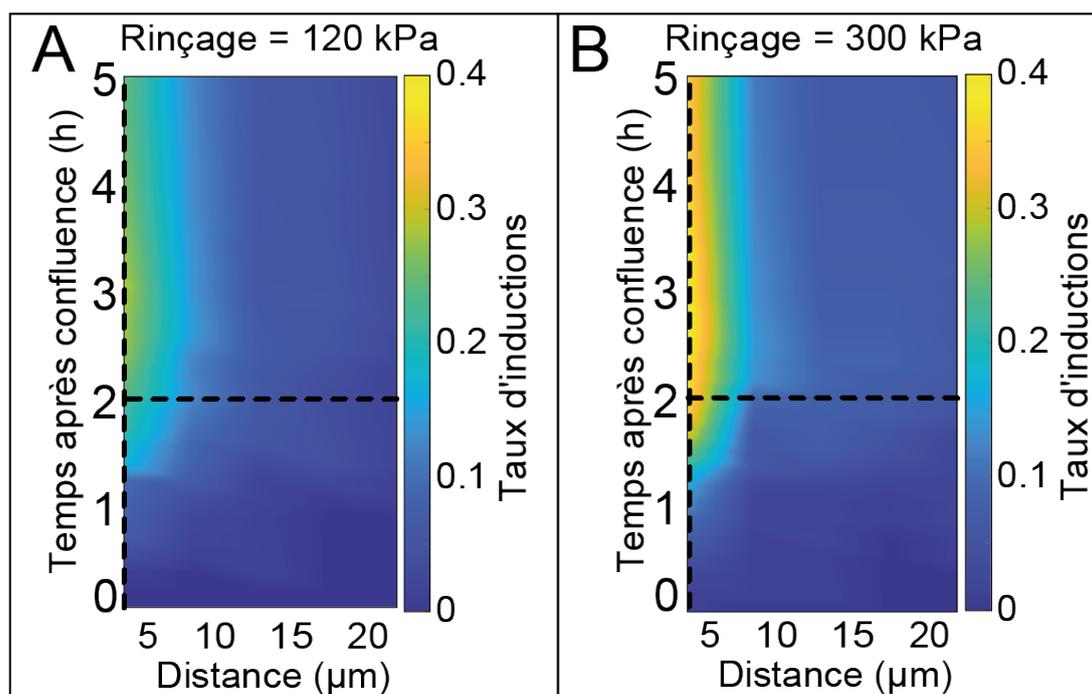


FIGURE 3.7 – Evolution du taux d'induction spatiotemporel en augmentant la vitesse de rinçage. (A) Condition contrôle (pression en entrée : 120 kPa) (B) Augmentation de la pression entrée à 300 kPa. Les lignes en noir représentent les sections le long desquelles nous avons extrait les probabilités temporelle et spatiale. 2 réplikas biologiques indépendants.

Nous observons (Fig. 3.8, droite) que le taux d'induction près du bord augmente avec le débit en entrée des chambres. La proportion de cellules qui induisent au bord ( $x = 2,5 \mu\text{m}$ ) entre 0 et 7 h est supérieure d'environ 38% lorsque le rinçage est augmenté à 300 kPa.

La dynamique temporelle du taux d'induction au bord suit la même tendance dans les deux conditions (Fig. 3.8, gauche) et nous observons un arrêt des inductions à partir de  $\sim 3 \text{ h}$  dans les

deux conditions. Cependant, le taux d'induction augmente plus rapidement au bord lorsque le rinçage est augmenté (en bleu) par rapport à la condition contrôle (en rouge).

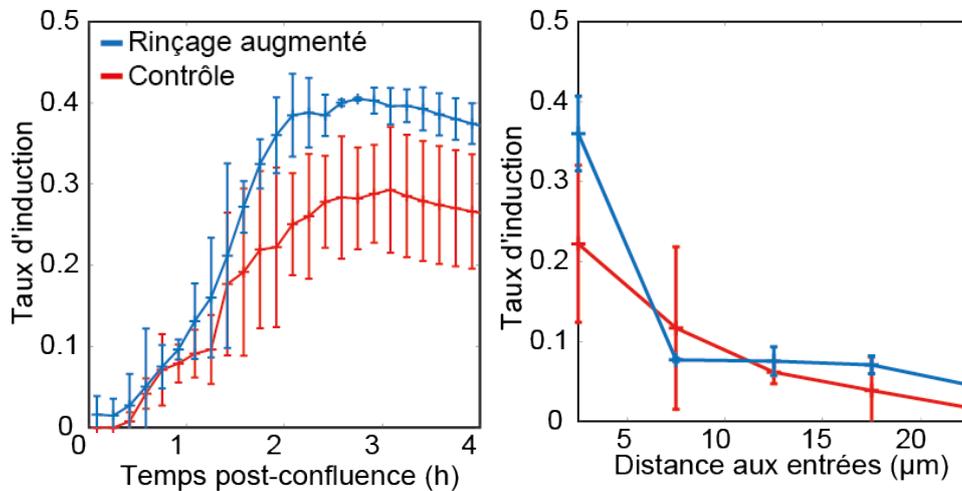


FIGURE 3.8 – Effet de l'augmentation de la pression exercée pour rincer le milieu de culture à 300 kPa sur le taux d'induction, par rapport au contrôle (120 kPa). **A gauche**, taux temporel à 2,5 μm du bord. **A droite**, taux spatial à 2 h post-confluence. Deux répliques biologiques, 27 et 41 chambres respectivement.

Ce résultat suggère que le débit de milieu renouvelé aux bords des chambres module en partie la probabilité spatio-temporelle d'induction. Quelle pourrait être la nature du stimulus à l'origine de cette modulation ?

### 3.3.2 Effet de la limitation de la sécrétion de farnésol sur le taux d'induction

Nous avons vu en introduction que *Candida albicans* sécrète une molécule de *quorum-sensing*, le farnésol, qui inhibe la transition levure-hyphale. Nous émettons l'hypothèse que la configuration de notre système permet l'accumulation de cette molécule à forte densité cellulaire. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons modulé le taux de sécrétion de farnésol en supplémentant le milieu avec de la pravastatine.

Tashiro *et al.* ont observé une diminution de la quantité de farnésol sécrété à 24 h lorsque de la pravastatine (64 μg/mL) est ajoutée au milieu de culture [273]. Les auteurs suggèrent que la pravastatine agit en inhibant la voie de synthèse de stérol dont le farnésol est un sous-produit, comme nous l'avons évoqué en introduction (partie 1.2.5). Les auteurs ont aussi vérifié que la pravastatine n'inhibe pas la prolifération de *C. albicans* aux concentrations  $\leq 128$  μg/mL. Pour caractériser l'impact de la pravastatine dans notre système, nous avons choisi d'utiliser une concentration de 64 μg/mL, similaire à celle de l'étude citée. Nous avons tracé les histogrammes spatiotemporels d'inductions correspondants (Fig 3.9).

Afin de vérifier l'éventuel impact de cette molécule sur la prolifération des cellules, nous comparons l'augmentation de pression induite par la croissance à la condition contrôle. Nous n'observons pas de différence significative ce qui suggère que les cellules ont proliféré selon une dynamique similaire dans les deux conditions (Fig. 3.10).

Nous n'avons réalisé cette expérience qu'une seule fois pour l'instant, les barres d'erreurs ne sont donc pas représentées. La proportion totale d'inductions augmente d'environ 50% lorsque

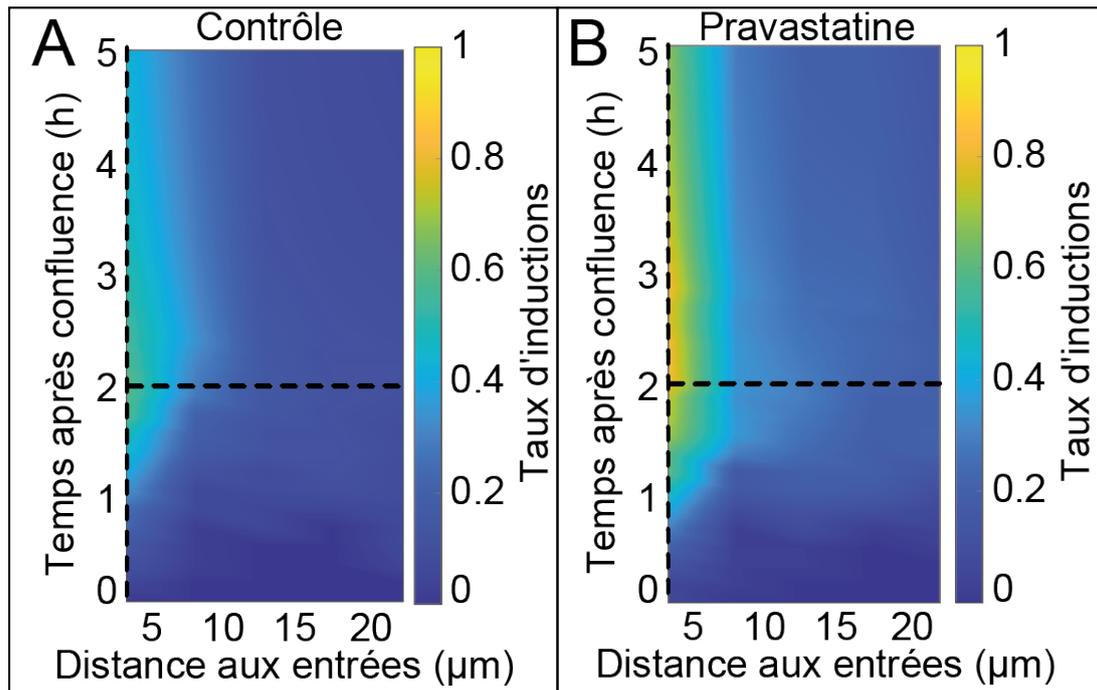


FIGURE 3.9 – taux d'induction spatio-temporel (A) expérience contrôle, (B) sous pravastatine (64µg/mL). Les lignes en noir représentent les sections le long desquelles nous avons extrait les probabilités temporelle et spatiale.

le milieu est supplémenté en pravastatine par rapport à la condition contrôle réalisée simultanément. Cette augmentation est bien plus marquée au bord des chambres ( $x = 2,5 \mu\text{m}$ ,  $t = 0 - 7 \text{ h}$ ) et s'élève à 192% par rapport au contrôle. Le taux d'induction maximal atteint au bord est de  $\sim 61\%$  pour le contrôle de cette expérience et  $\sim 83\%$  pour la condition test (Fig. 3.11).

Cette expérience et l'étude citée suggèrent que le farnésol est au moins en partie responsable de l'inhibition de la morphogénèse dans notre système. La modulation observée présente la même tendance que dans le cas étudié dans le chapitre précédent : le farnésol semble retarder et limiter les inductions à l'échelle de la population.

### 3.4 Un modèle spatio-temporel pour décrire le taux d'induction sous pression de croissance

#### 3.4.1 Hypothèses du modèle

A partir de ces observations, nous proposons de redéfinir les hypothèses proposées dans la partie 3.2.2. Plus précisément, nous proposons que la sécrétion de farnésol endogène, couplée au rinçage via la perfusion de la puce, permettent d'expliquer en partie la dynamique spatio-temporelle des inductions sous pression de croissance dans notre système.

Nous proposons de modéliser le taux d'induction par un produit de probabilités tel que :

$$\mathbb{P}_{\text{activation}} \times (1 - \mathbb{P}_{\text{inhibition}}) \times \mathbb{P}_{\text{pression}}$$

Comme évoqué dans la partie précédente, nous proposons que les cellules peuvent initier la

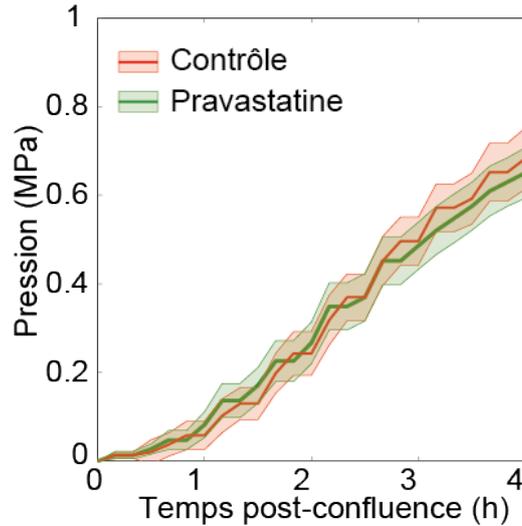


FIGURE 3.10 – Les cellules développent de la pression de croissance avec la même dynamique sous pravastatine, suggérant que cette molécule n’impacte pas leur prolifération. (Médiane, déviation standard).

morphogénèse lorsqu’elles intègrent le changement physico-chimique favorable, puis réentrent dans le cycle pour initier la croissance polarisée.

Zheng *et al.* [319] ont décompté le pourcentage de cellules qui réentrent dans le cycle au cours du temps dans une population de levures *C. albicans* synchronisée en  $G_1$  par élutriation (Figure 2-B de l’article). D’après l’allure de la courbe obtenue, nous proposons de représenter le taux de réentrée dans le cycle par la probabilité cumulée d’une loi normale. Dans notre cas, la population n’est pas synchronisée et nous ne pouvons donc pas directement utiliser le résultat cité. Nous allons donc entrer la valeur moyenne ( $\mu$ ) et l’écartype ( $\sigma$ ) de cette loi comme paramètres à ajuster par le modèle.

Ensuite, d’après les observations faites dans le chapitre précédent, nous proposons qu’il existe une concentration inhibitrice de farnésol telle que le taux d’induction dans la population stimulée est réduit de 50%. En première approche, nous décrivons ce phénomène d’inhibition par une simple sigmoïde telle que :

$$(1 - \mathbb{P}_{\text{inhibition}}) = \frac{1}{1 + \frac{C(x,t)}{C_{50}}}$$

Où  $C(x,t)$  est la concentration locale de farnésol endogène (mol/L), qui peut varier en fonction du temps et de l’espace, et  $C_{50}$  est la concentration inhibitrice (mol/L) et  $\mathbb{P}_{\text{inhibition}}$  représente la probabilité de répression de la morphogénèse par le farnésol.

Enfin,  $\mathbb{P}_{\text{pression}}$  représente la probabilité d’induire lorsque le stimulus favorable est appliqué. Dans le chapitre 2, nous avons observé qu’en appliquant un stimulus favorable à l’émergence d’hyphes la population s’accumule progressivement dans l’état hyphal. La proportion d’hyphes tend vers une valeur asymptotique, que nous nommons  $\alpha$ .  $\alpha$  représente la probabilité maximale d’induire sous ce stimulus et dans les conditions physico-chimiques appliquées.

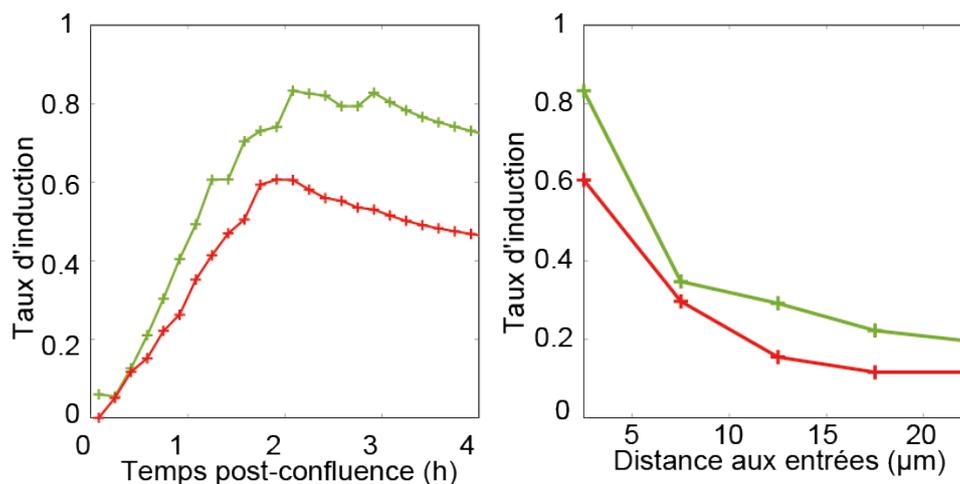


FIGURE 3.11 – taux d'induction avec et sans addition de pravastatine (64 µg/mL). A gauche, taux temporel à 2,5 µm du bord. A droite, taux spatial à 2 h post-confluence. Un réplica biologique, 13 et 14 chambres respectivement.

### 3.4.2 Modèle décrivant la concentration locale de farnésol endogène sous pression de croissance

#### Equation d'advection-diffusion à une dimension en milieu poreux

Nous souhaitons évaluer la concentration de farnésol sécrété dans la population dense sous pression de croissance. **Nous proposons de décrire la concentration locale en utilisant un modèle d'advection-diffusion dans un milieu poreux.** Dans cette première itération, nous proposons de simplifier le problème en décrivant le modèle dans une dimension seulement (le long d'une ligne de champ de l'axe spatial  $x$ ).

A partir de la loi de conservation de masse en milieu poreux, nous écrivons :

$$\epsilon \frac{\partial C}{\partial t} = \epsilon D_{\parallel} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \epsilon D_{\perp} \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} - \langle \vec{v} \rangle_x \frac{\partial C}{\partial x} + \Lambda$$

Où  $\epsilon$  est la porosité moyenne dans l'assemblée de cellules confinées ( $\frac{V_{\text{libre}}}{V_{\text{total}}}$ ),  $C$  est la concentration locale de farnésol (mol/L),  $\langle \vec{v} \rangle_x$  la vitesse moyenne dans le poreux (vitesse de Darcy) selon la direction  $x$  (m/s),  $D_{\parallel}$  et  $D_{\perp}$  les composantes longitudinale et transverse du tenseur de diffusion dans le poreux et  $\Lambda$  le terme source.

#### Terme source et simplification du modèle au régime quasi-stationnaire

Hornby *et al.* [127] ont mesuré le taux de production effectif de farnésol dans une culture en tube à 30°C après 24 h par spectrométrie de masse. La quantité de farnésol  $m_{FOH}$  produite et libérée dans le milieu de culture par la souche sauvage CAI-4 (même fond génétique que la construction que nous utilisons) est de 0,120-0,133 mg/g (par grammes de masse sèche de cellules). Ces mesures ont été effectuées à partir du surneageant des cultures en question. Elles indiquent la quantité de farnésol accumulé dans l'environnement extracellulaire et ne tient pas compte de l'accumulation de la molécule dans les cellules (membrane et cytoplasme).

A partir de cette valeur, nous estimons que le taux de production par cellule et par seconde est :

$$s = \frac{m_{\text{FOH}}}{M_{\text{FOH}} \times 24 \times 3600} \times m_{\text{cellule}} = 2,3 \cdot 10^{-22} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1} \text{ par - cellule}$$

Où  $M_{\text{FOH}}$  est la masse molaire du farnésol ( $222,6 \pm 0,014 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) et  $m_{\text{cellule}}$  est la masse sèche contenue dans une levure, nous prenons la valeur de  $33,3 \text{ pg}$  [149]. Nous souhaitons décrire une concentration locale et non une quantité, nous écrivons donc le terme source sous la forme :

$$\Lambda = \frac{s}{V_{\text{elementaire}}}$$

Avec  $V_{\text{elementaire}}$  le volume libre par cellule dans le poreux considéré. **Nous considérons uniquement les  $N_{\text{cellules}}$  situées au plan focal, contre la lamelle de verre, au bas de la chambre.** En effet, nous avons décompté les inductions et le nombre de cellules uniquement pour ce plan focal. Les cellules ont un diamètre approximatif de  $5 \mu\text{m}$ , nous supposons donc que cette couche de cellules est répartie dans un volume total  $V_{\text{total}}$  de  $5 \times 40 \times 50 \mu\text{m}^3$ . Lorsque les cellules prolifèrent et remplissent ce volume, le volume de liquide  $V_{\text{libre}}$  dans lequel est dilué le farnésol diminue, ce volume libre vaut  $\epsilon \times V_{\text{total}}$ . Nous proposons que le volume libre local peut être estimé en divisant le volume libre  $V_{\text{libre}}$  par le nombre de cellules total au bas de la chambre. Nous obtenons :

$$\Lambda = \frac{s \cdot N_{\text{cellules}}}{V_{\text{total}} \cdot \epsilon} (\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1})$$

Nous supposons que  $s$ , le taux de sécrétion effectif de farnésol, est constant et ne dépend pas de la densité de la population, de la durée du cycle cellulaire ou de la pression appliquée. Nous négligeons également tout phénomène d'adsorption de farnésol aux parois de PDMS.

Le temps caractéristique de diffusion dans ce poreux constitué de cellules (à partir de la confluence) peut être estimé par la grandeur :

$$\tau = \frac{l_{\alpha}^2}{D}$$

Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature le coefficient de diffusion du farnésol en milieu aqueux. Nous choisissons d'approximer cette valeur par celle du glucose dont le poids moléculaire est proche ( $\sim 180 \text{ g/mol}$ ), soit  $740 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à  $30^{\circ}\text{C}$  [152].

La grandeur  $l_{\alpha}$  représente la taille typique d'un pore, nous estimons qu'après confluence la taille des pores entre les cellules est de l'ordre de  $1 \mu\text{m}$ . En utilisant ces valeurs nous estimons que le temps caractéristique de diffusion  $\tau$  vaut  $\sim 0,01 \text{ s}$ . Ce temps caractéristique est donc de l'ordre de la seconde, tandis que le temps caractéristique de prolifération des cellules est de l'ordre de l'heure (cycle cellulaire). Nous nous plaçons donc en régime quasi-stationnaire et nous négligeons la quantité  $\frac{\partial C}{\partial t}$ .

Nous négligeons aussi la composante transverse de la diffusion dans le poreux ( $D_{\perp}$ ) en supposant que le rayon transverse moyen des pores entre les cellules est inférieur à leur longueur moyenne.

### Détermination de la vitesse moyenne et du nombre de Péclet du poreux

Le nombre de Péclet permet de comparer l'importance de la diffusion et de l'advection sur le transport et la dispersion des molécules. Dans le cas d'un milieu poreux il est décrit comme suit :

$$\text{Pe} = \frac{l_{\alpha} \cdot \langle \vec{v} \rangle_x}{\epsilon \cdot D_m}$$

En négligeant la résistance du poreux, nous estimons la vitesse moyenne du fluide à confluence à :

$$\langle \vec{v} \rangle_x \cong \frac{Q_{in}}{S}$$

Avec  $S$  la section totale de chambre vide traversée, estimée à  $260 \mu\text{m}^2$  ( $10 \mu\text{m} \times 26 \mu\text{m}$ ) et  $Q_{in}$  le débit desservi d'un côté ( $0,16 \text{ nL/s}$ ). Nous obtenons  $\langle \vec{v} \rangle_x \cong 700 \mu\text{m/s}$ .

Delarue *et al.* ont estimé la porosité par exclusion de fluorescence dans le même système pour les levures *S. cerevisiae* en fonction de la pression de croissance [74]. Nous avons également tenté d'utiliser cette technique avec de la R ITC conjuguée Dextran (70 kDa). Cependant, cette forme conjuguée semble interagir avec les parois de PDMS et nous avons observé une augmentation de la fluorescence à forte densité de cellules contrairement aux observations de l'étude citée. Il nous faudrait donc, soit passer la surface de PDMS, soit utiliser une autre molécule conjuguée. Le volume et le diamètre moyen de *C. albicans* et *S. cerevisiae* étant similaire, nous allons pour l'instant utiliser les données obtenues dans cette étude. La porosité à confluence est estimée à 0,6 (Fig. 3.12).

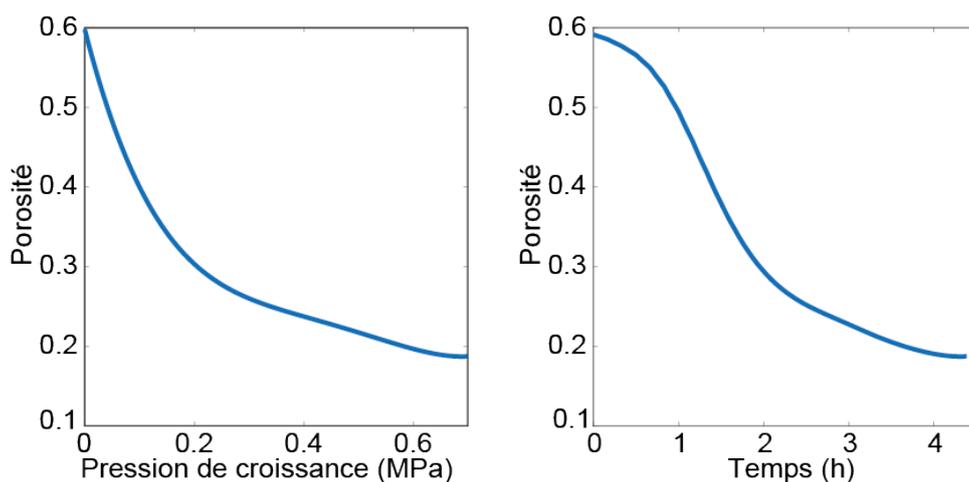


FIGURE 3.12 – Porosité estimée à partir des données de l'études de Delarue *et al.* [74], en fonction de la pression de croissance et en fonction du temps après arrivée à confluence.

Le nombre de Péclet moléculaire est ainsi estimé à confluence à :

$$Pe = \frac{l_a \cdot \langle \vec{v} \rangle_x}{\epsilon \cdot D_m} \cong 1,6$$

Cette valeur étant proche de 1, le transport dans le poreux est plutôt dominé par la diffusion à partir de la confluence. Ainsi, nous approximons la valeur de la diffusion longitudinale  $D_{||}$  dans le poreux par la diffusion moléculaire  $D_m = 740 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [91].

Finalement, nous obtenons l'équation différentielle suivante :

$$\epsilon D_m \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \langle \vec{v} \rangle_x \frac{\partial C}{\partial x} + \frac{s \cdot N_{cellules}}{\epsilon \cdot V_{total}} = 0$$

### Equation décrivant la concentration locale de farnésol le long de la demi-largeur de la chambre

Le farnésol étant sécrété par les cellules, pour résoudre  $C(x, N_{\text{cellules}})$  nous établissons les conditions limites suivantes :

- la concentration est nulle au bord de la chambre, à l'interface avec les canaux d'entrée, lorsque  $x = 0 \mu\text{m}$ ,
- la concentration est maximale au centre de la chambre, lorsque  $x = 25 \mu\text{m}$ .

Ces deux conditions supposent donc que :

$$\left\{ \begin{array}{l} C(x = 0) = 0 \\ \frac{\partial C}{\partial x}(x = L_{\text{centre}}) = 0 \end{array} \right.$$

En résolvant, nous obtenons le profil de concentration locale le long de l'axe  $x$  qui dépend du nombre de cellules, sous la forme :

$$C(x, N_{\text{cellules}}) = \frac{s \cdot N_{\text{cellules}}}{\epsilon \cdot V_{\text{total}} \cdot \langle \vec{v} \rangle_x} \left[ \frac{\epsilon \cdot D_m}{\langle \vec{v} \rangle_x} \cdot e^{-\frac{L_{\text{centre}} \cdot \langle \vec{v} \rangle_x}{\epsilon \cdot D_m}} \cdot \left( 1 - e^{\frac{x \cdot \langle \vec{v} \rangle_x}{\epsilon \cdot D_m}} \right) + 1 \right]$$

### 3.4.3 Prédictions théoriques du modèle

#### Concentration spatio-temporelle locale de farnésol

En utilisant toutes les valeurs obtenues dans la littérature, l'estimation du nombre de cellules au bas de la chambre et la vitesse moyenne (en négligeant la résistance du poreux) nous obtenons le profil spatial de concentration présenté figure 3.13-A. D'après notre modèle, la probabilité d'inhibition des inductions par le farnésol ( $\mathbb{P}_{\text{FOH}}$ ) augmente rapidement avec la distance aux entrées de milieu. Nous avons représenté les profils de *permissivité* du farnésol ( $1 - \mathbb{P}_{\text{FOH}}$ ) figure 3.13. C'est cette quantité que nous utilisons pour obtenir le taux d'induction.

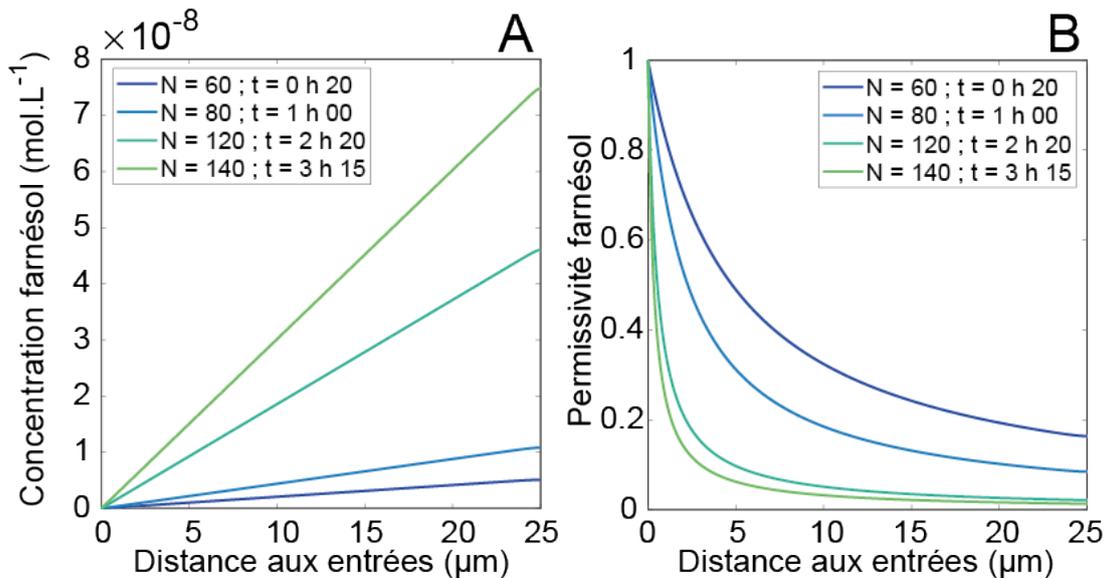


FIGURE 3.13 – (A) Profils de concentration locale de farnésol sécrété en fonction de la distance aux entrées, pour différents temps et nombres de cellules. (B) Profils correspondants de permissivité à l'induction par le farnésol.

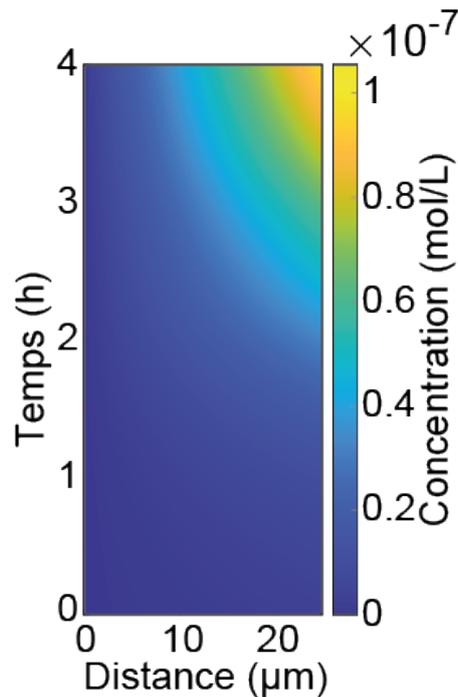


FIGURE 3.14 – Prédiction du modèle sur la concentration locale de la molécule inhibitrice d'initiation hyphale (farnésol) en fonction du temps post-confluence (sous pression de croissance) et de la distance aux entrées de renouvellement de milieu.

D'après notre modèle la concentration de farnésol atteint son maximum au centre de la chambre sous forte densité de cellules. Avec les valeurs théoriques utilisées, au bout de 4 h après confluence, elle atteint les 100 nM au centre, et seulement  $\sim 0,5$  nM à 2,5  $\mu\text{m}$  du bord.

### Dynamique d'induction d'hyphes dans nos puces microfluidiques

Dans la suite de l'étude, nous émettons l'hypothèse qu'aux temps longs, 100% de la population stimulée mécaniquement induit un hyphe en dehors de toute inhibition par le farnésol. Nous allons fixer la constante correspondant à la valeur asymptotique de la probabilité d'activation,  $\alpha$ , à 1. Ce facteur traduit avec quelle efficacité maximale les cellules induisent dans l'environnement physico-chimique appliqué. Autrement dit, nous supposons qu'aux temps longs, 100% de la population aura induit un hyphe et qu'il n'existe pas de sous-population qui n'induit jamais. C'est le cas que nous retrouvons chapitre 2 durant l'induction sous 20% sérum à 37°C.

Nous supposons que la dynamique de la réponse biologique d'induction au stimulus mécanique est au moins plus rapide que la dynamique de passage dans le cycle cellulaire qui est de l'ordre de l'heure. Nous estimons que ces grandeurs ne peuvent être discriminées sans sur-ajuster le modèle proposé dans ces travaux. D'autre part nous négligeons la pression seuil nécessaire au déclenchement de l'induction car nous avons observé les premières inductions dès la confluence pour des valeurs en deçà des seuils de détection de notre système d'analyse ( $\sim 10\text{kPa}$ ).

Ainsi, nous considérons que la probabilité d'induction en fonction de la pression est une fonction de Heaviside  $\mathbb{H}_0(P)$  qui vaut 0 lorsque la pression de croissance  $P$  est nulle (pré-confluence) et sature instantanément à la valeur asymptotique, la constante  $\alpha=1$ , lorsque  $P \geq 0$ .

Nous pouvons ainsi récapituler qualitativement la tendance observée expérimentalement sous pression de croissance, en traçant la permissivité spatio-temporelle de farnésol, la probabilité de

réentrée dans le cycle après confluence, et le produit de ces probabilités (Fig. 3.15).

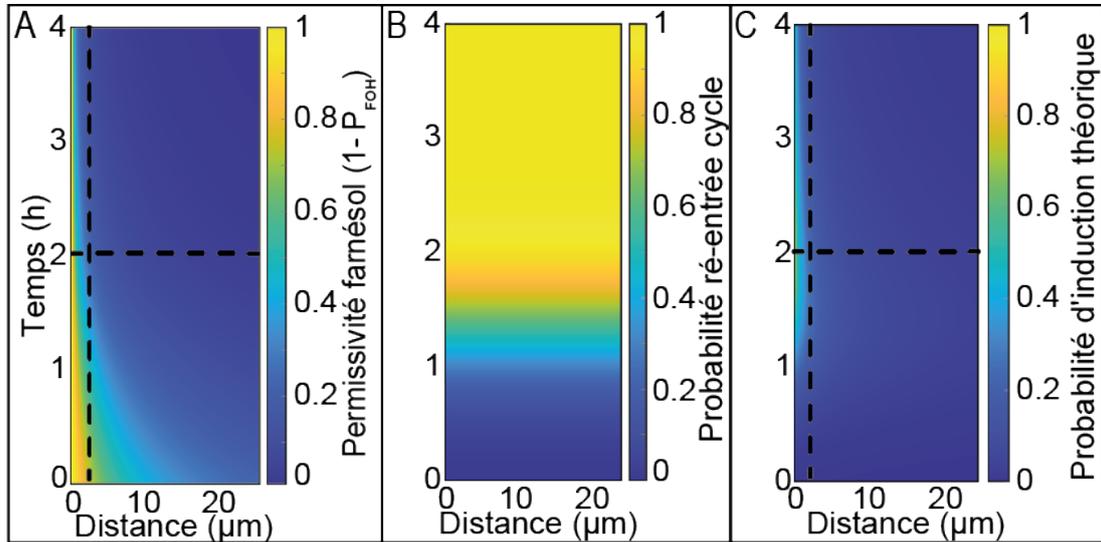


FIGURE 3.15 – Prédictions spatio-temporelles du modèle non-ajusté. (A) Permissivité du farnésol. Lorsque cette quantité vaut 1, alors le farnésol n'inhibe pas les cellules. (B) Probabilité de réentrée dans le cycle cellulaire passé la confluence pour la population asynchrone. Nous utilisons la cumulée d'une loi normale centrée sur la durée moyenne du cycle. (C) Produit des deux probabilités décrivant le taux d'induction sous rinçage et pression de croissance selon nos hypothèses.

Dans la suite, nous allons ajuster sur les données expérimentales des conditions contrôles les paramètres suivants (qui sont pour l'instant définis arbitrairement) :

- $\mu$ , le temps moyen de réentrée dans le cycle (h), en supposant une loi normale
- $\sigma$ , la variabilité de temps de réentrée dans le cycle (h)
- $\frac{s}{C_{50}}$ , le rapport entre la vitesse de sécrétion par cellule (mol/s), et la dose inhibitrice d'induction (mol/L).

Ensuite, nous observerons la prédiction du modèle pour les conditions testées précédemment : augmentation du débit en entrée et ajout de pravastatine limitant la vitesse de sécrétion. Pour faire ces ajustements nous utilisons là-aussi la fonction *fminsearch* de Matlab avec comme grandeur à minimiser la somme des écarts modèle-observations au carré (méthode des moindres carrés).

Nous avons tenté de résoudre directement ce système en ajustant des surfaces avec le modèle de probabilité spatio-temporelle  $\mathbb{P}(x, t)$ . Cependant, l'ajustement par la méthode des moindres carrés telle que nous l'avons employée est trop instable et sensible aux paramètres en entrée du modèle. Nous allons donc traiter séparément l'ajustement temporel et spatial dans ce manuscrit. Une illustration des profils spatial (A) et temporel (B) des probabilités est donnée figure 3.16 afin de mieux visualiser le comportement du modèle proposé.

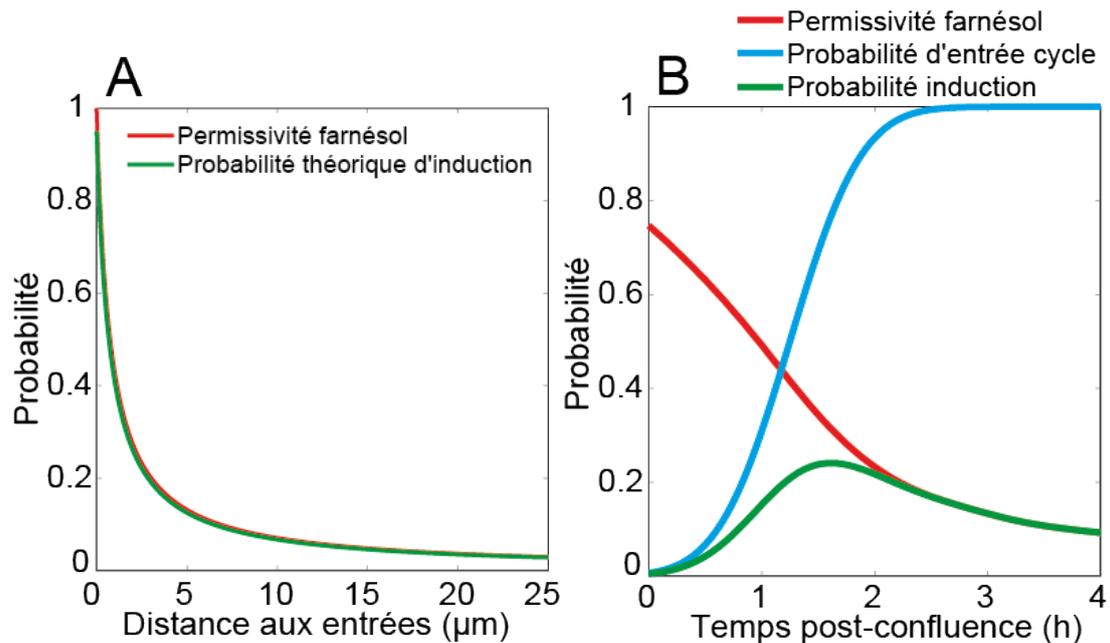


FIGURE 3.16 – Prédiction spatiale et temporelle du modèle non-ajusté. (A) Profil de permissivité du farnésol, et probabilité d'induction le long de la demi-largeur de la chambre 2h après confluence. (B) Permissivité du farnésol, probabilité de réentrée dans le cycle cellulaire passé la confluence, et taux d'induction théorique résultant du produit de ces probabilités, au bord de la chambre (2,5 µm).

### 3.5 Ajustement des paramètres du modèle sur l'ensemble des expériences contrôlées

#### 3.5.1 Ajustement du modèle sur le taux temporel

Afin d'évaluer notre modèle, nous avons commencé par ajuster les paramètres sur l'ensemble des expériences en condition contrôle avec une pression en entrée du système de perfusion à 120 kPa (Fig. 3.17).

Nous obtenons les paramètres suivants pour l'ajustement temporel au bord de la chambre, près des entrées ( $x = 2,5 \mu\text{m}$ ) :

- $\mu = 2,0 \text{ h}$ ,
- $\sigma = 0,8 \text{ h}$ ,
- $\frac{s}{C_{50}} = 1,3 \cdot 10^{-11} \text{ L/s}$ ,
- somme des résidus de l'ajustement : 0,002.

Si nous supposons que la valeur de taux de sécrétion par cellule,  $s$  est identique à celle mesurée par Hornby *et al.* [127] alors la concentration inhibitrice  $C_{50}$  estimée est de l'ordre de  $10^{-2} \text{ nM}$ . Cette valeur est plus faible de cinq ordres de grandeurs par rapport à la dose inhibitrice estimée dans le chapitre 2 avec du sérum ( $\sim 1 - 10 \mu\text{M}$ ) et par rapport aux données observées de multiples stress inductifs chimiques dans la littérature [203].

Il est possible que la dose inhibitrice de farnésol soit effectivement bien plus faible dans des conditions physico-chimique favorables aux levures. Le milieu que nous utilisons est ajusté à pH

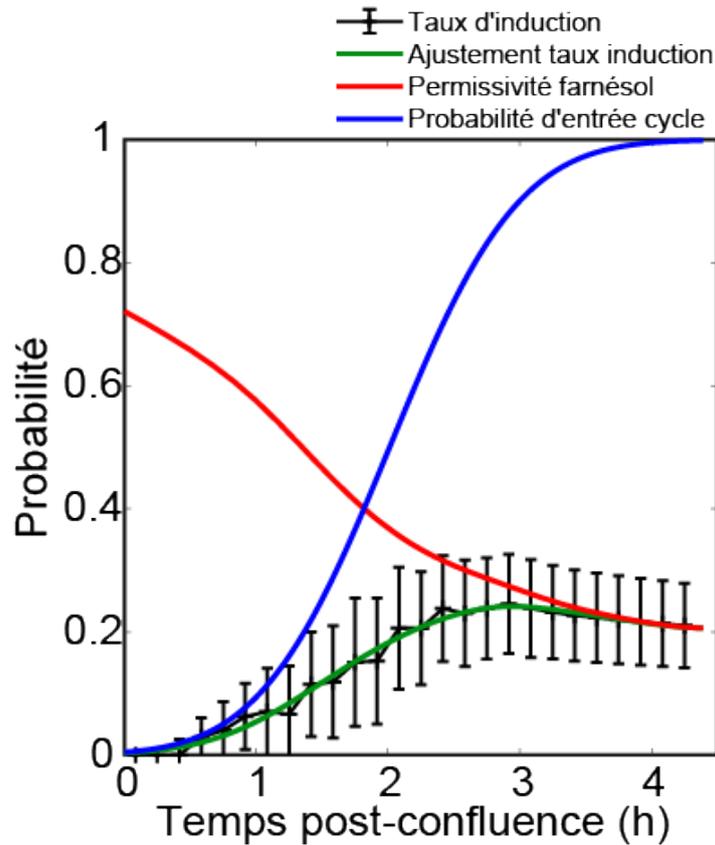


FIGURE 3.17 – Ajustement des paramètres du modèle sur les observations expérimentales dans le cas du taux d'induction à  $2,5 \mu\text{m}$  des entrées de milieu en fonction du temps.

relativement acide (pH5,5) et la puce est thermalisée à  $30^\circ\text{C}$ , des conditions peu favorables à la croissance hyphale. Bien sûr, il est également possible que notre estimation de la vitesse de sécrétion soit également éloignée de sa valeur réelle notamment si le taux de sécrétion dépend du pH et de la pression de croissance.

Les valeurs ajustées  $\mu$  et  $\sigma$  sont proches de l'heure ce qui est attendu selon nos hypothèses car la durée moyenne du cycle cellulaire chez *C. albicans* à  $30^\circ\text{C}$  est d'environ 1 h 20. La valeur médiane  $\mu$  de la loi normale est légèrement supérieure à la durée moyenne du cycle. Cela suggère que la pression de croissance allonge la durée du cycle cellulaire. Ce résultat est aussi suggéré par le ralentissement de la dynamique d'augmentation du nombre de cellules, et de la pression de croissance qui en découle (Fig. 3.2).

### 3.5.2 Ajustement du modèle sur le taux spatial

Pour faire l'ajustement du modèle spatial nous procédons un peu différemment. Nous nous plaçons 2 h après confluence et nous ajustons deux paramètres sur les observations le long de l'axe  $x$  :

- $\beta$ , un pré-facteur sans dimension, qui dépend du temps, et qui représente la probabilité de réentrée dans le cycle à l'instant  $t$  (probabilité "d'activation"),
- $\frac{s}{C_{50}}$ , le rapport entre la vitesse de sécrétion par cellule (mol/s), et la dose inhibitrice de farnésol (mol/L)

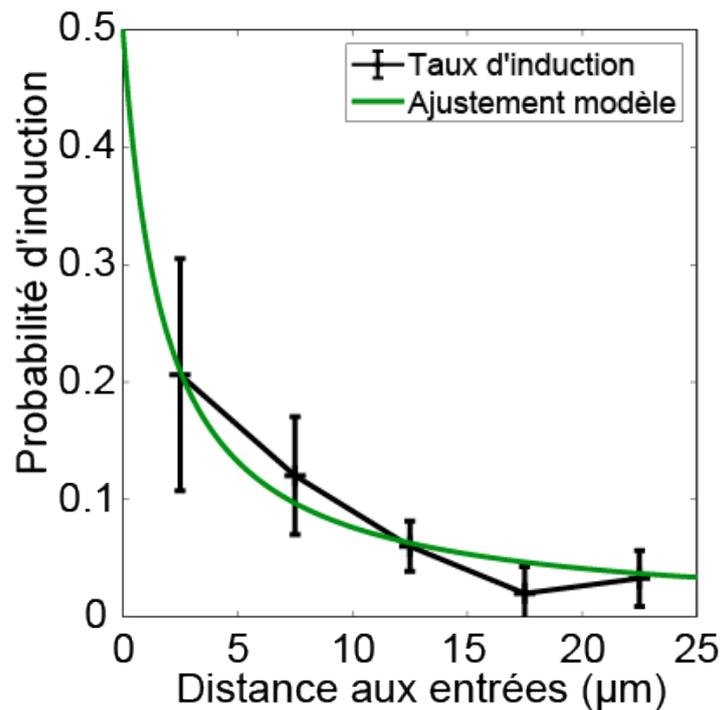


FIGURE 3.18 – Ajustement des paramètres du modèle sur les observations expérimentales dans le cas du taux d'induction à 2 h post-confluence, en fonction de la distance aux entrées de milieu.

En ajustant ces deux paramètres (Fig. 3.18) sur la condition contrôle le long de  $x$  nous obtenons :

- $\beta = 0,50$ ,
- $\frac{s}{C_{50}} = 1,0 \cdot 10^{-11}$  L/s,
- somme des résidus 0,0007.

La valeur de  $\beta$  est très proche de la valeur de la probabilité d'activation temporelle au bord de la chambre à 2 h qui est estimée à 0,49. En revanche, nous obtenons une quantité  $\frac{s}{C_{50}}$  inférieure de 30% à la valeur ajustée au bord en fonction du temps. L'ajustement temporel au bord semble donc sous-estimer la valeur de la dose inhibitrice de farnésol par rapport à l'ajustement spatial.

### 3.5.3 Bilan sur l'ajustement du modèle

Comme nous l'avons précisé dans le paragraphe précédent, le paramètre  $C_{50}$  (dose d'inhibitrice de farnésol) estimé par le modèle proposé est cinq à six ordres de grandeurs inférieur à ceux estimés dans la littérature. Au-delà des hypothèses émises sur les aspects biologiques, nous nous sommes interrogés sur un potentiel artefact provenant du modèle lui-même. Cette valeur très faible trouve peut-être en partie son origine dans une surestimation de la porosité à forte densité de cellules sous pression de croissance.

En effet, Delarue *et al.* ont estimé la porosité à  $\sim 0,2$  lorsque la pression développée par les cellules est de 700 kPa (soit environ 4 h après confluence dans notre cas). Il est possible que la dépendance entre porosité et pression développée soit différente dans le cas de *C. albicans*. Il est également possible que la perméabilité du mur cellulaire des levures augmente sous pression de croissance, permettant alors la pénétration de Dextran conjugué dans le cytoplasme, ce qui amène

à sous-estimer la diminution de la porosité. Cela pourrait expliquer l'écart des valeurs obtenues entre l'ajustement spatial et temporel.

Si la porosité à forte pression est surestimée de 30%, ce qui représente un écart de 0,06, alors d'après l'équation décrivant la probabilité d'inhibition nous nous attendons à une augmentation de ~30% de la dose inhibitrice. Cependant, un écart de quelques pourcents de la porosité dans l'équation décrivant  $C(x,t)$ , n'explique pas à lui seul l'écart de ~2 à 3 ordres de grandeurs de cette dose par rapport aux données de la littérature.

Un autre aspect que nous avons jusqu'alors négligé est la résistance hydrodynamique développée par l'assemblée de cellules constituant le poreux. En effet, nous avons supposé cette résistance négligeable par rapport à celle des 6 canaux de nutrition. Nous allons dans la suite tenter de vérifier cette hypothèse. Si la résistance hydrodynamique devient rapidement grande après l'arrivée à confluence des cellules, alors nous nous attendons à ce que la vitesse moyenne dans le poreux diminue, et que la concentration de farnésol augmente plus rapidement. Par conséquent, le paramètre ajusté  $\frac{S}{C_{50}}$  devrait diminuer.

## 3.6 Estimation de la résistance hydrodynamique théorique du poreux constitué de cellules

### 3.6.1 Approximation de Kozeny-Carman

Afin d'évaluer la résistance hydrodynamique développée par le poreux formé de cellules, nous allons utiliser l'approximation de Kozeny-Carman. Nous avons opté en premier lieu pour cette description simple et très référencée dans la littérature. Cependant nous verrons rapidement dans la suite de l'étude que cette approximation assez grossière ne tient pas compte de l'aspect "biologique" de notre système, qui est **vivant** et **déformable**.

Ce modèle est initialement adapté pour décrire la filtration dans des milieux composés de pores cylindriques parallèles et de diamètres identiques. Cette loi décrivant la perméabilité du poreux comporte une constante empirique  $K$  sans dimension comprise entre 2 et 10. Cette constante illustre la géométrie du milieu, elle est le produit d'un terme décrivant le facteur de forme des obstacles et d'un autre décrivant la tortuosité du réseau de capillaires. Dans le cas d'un milieu granulaire, composé d'un arrangement régulier de **sphères incompressibles et mono-dispersées**, cette constante vaut ~ 5 [281]. La vitesse moyenne dans le milieu poreux est alors décrite par la relation suivante :

$$\langle \vec{v} \rangle = \frac{\Delta P}{\eta \cdot L_{\text{poreux}}} \frac{\epsilon^3}{K \cdot S_p^2 (1 - \epsilon)^2}$$

Avec  $\Delta P$  le différentiel de pression (Pa),  $\eta$  la viscosité dynamique du fluide (Pa.s),  $L_{\text{poreux}}$  la longueur du poreux traversé (m). La quantité  $\frac{\epsilon^3}{K \cdot S_p^2 (1 - \epsilon)^2}$  décrit la perméabilité du milieu ( $\text{m}^2$ ), avec  $K$  la constante de Kozeny-Carman,  $\epsilon$  la porosité et  $S_p$  la surface spécifique des objets constituant le milieu ( $\text{m}^{-1}$ ) c'est-à-dire le rapport en surface et volume moyen des particules.

Dans notre système le "bouchon" de cellules (poreux) et les canaux d'entrée sont sur le même chemin fluide. La résistance équivalente des 6 canaux d'entrée  $R_{\text{in}}$  est donc en série avec celle du bouchon  $R_b$  ( $\text{Pa.s.m}^{-3}$ ). Il s'ensuit que la vitesse moyenne dans le poreux peut être décrite comme suit en fonction de la porosité :

$$\langle \vec{v} \rangle = \frac{\Delta P}{S_{\text{poreux}} \cdot (R_{\text{in}} + R_b)} = \frac{\Delta P}{S_{\text{poreux}} \left( R_{\text{in}} + \frac{\eta \cdot L_{\text{poreux}} \cdot K \cdot S_p^2 (1-\epsilon)^2}{S_{\text{poreux}}} \right)}$$

Nous déterminons chacune de ces grandeurs :

- $S_{\text{poreux}} = 200 \mu\text{m}^2$ , la section transverse totale du poreux ( $10 \times 40 \mu\text{m}$ ),
- $R_{\text{in}} = \frac{R_{\text{canal}}}{6} = 8 \cdot 10^{17} \text{Pa.s.m}^{-3}$ ,
- $\eta = 0,8 \cdot 10^{-3} \text{Pa.s}$  (nous prenons la viscosité dynamique de l'eau à 30°C),
- $L_{\text{poreux}} = L_{\text{centre}} = 25 \mu\text{m}$ , nous approximons la longueur traversée à la demi-largeur de la chambre,
- $K = 5$ ,
- $S_p \cong 1,13 \cdot 10^6 \text{m}^{-1}$  chez *S. cerevisiae* [281].

### 3.6.2 La résistance du poreux est théoriquement négligeable pour les porosités mesurées

Afin de vérifier l'importance de la résistance du poreux par rapport à la résistance des canaux sub-micrométriques, nous traçons ces deux quantités en fonction de valeurs théoriques de porosité (Fig. 3.19, à gauche). Nous constatons que la résistance du bouchon est inférieure d'un facteur 10 pour des porosités entre 0,2 et 0,3. Elle est 100 fois plus faible lorsque la porosité devient supérieure à environ 0,3. Or, la porosité n'atteint la valeur de 0,2 qu'à partir seulement 3 h 30 après la confluence lorsque la pression de croissance parvient à environ 600 kPa.

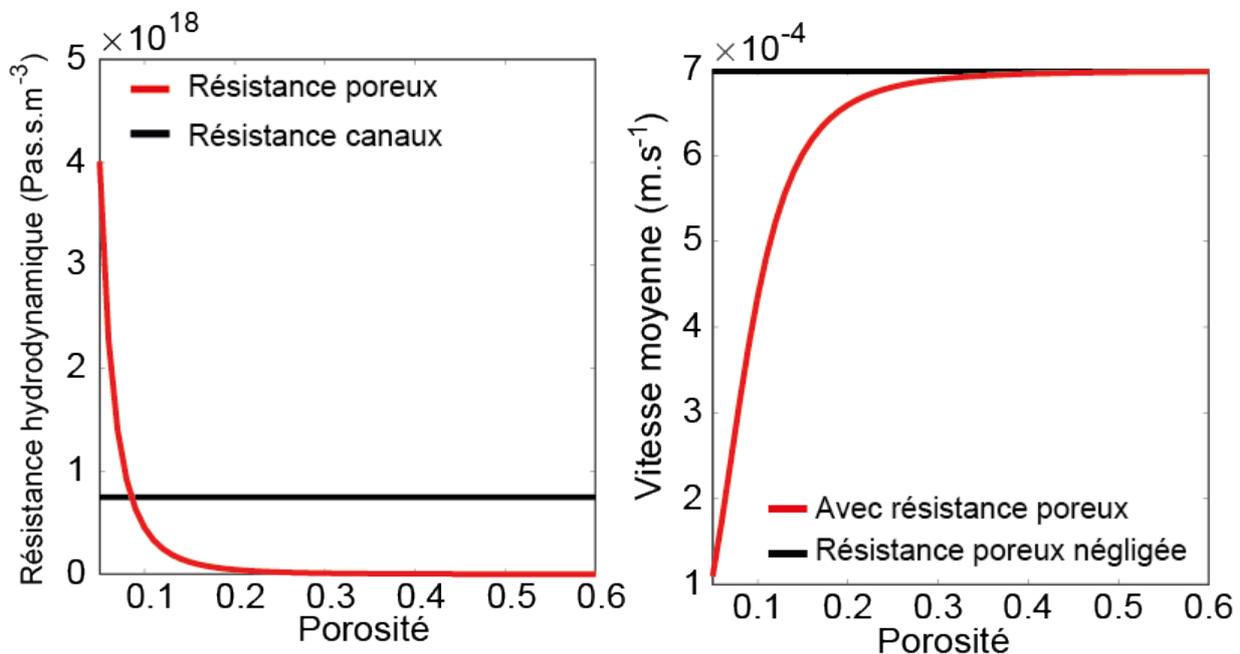


FIGURE 3.19 – **A gauche**, résistance hydrodynamique du poreux (cellules sous pression de croissance, demi-largeur de chambre) estimée avec l'approximation de Kozeny-Carman, par rapport à la résistance équivalente des 6 canaux d'entrée de milieu présents d'un côté de la chambre. **A droite**, la vitesse diminue de façon importante lorsque la porosité devient faible ( $< 0,2$ ) et que la résistance du poreux est prise en compte.

Nous avons ensuite tracé la vitesse moyenne  $\langle \vec{v} \rangle$  dans le poreux sur la même gamme de porosité et en tenant compte de sa résistance hydrodynamique (Fig. 3.19, à droite). Nous constatons que la vitesse moyenne diminue de seulement 6% lorsque la porosité atteint 0,2. Si la gamme de porosité mesurée en fonction de la pression de croissance est juste, alors cet écart ne suffit pas à corriger la dose d'inhibition d'un facteur  $10^5$ .

Pour illustrer ce propos nous avons également tracé la concentration de farnésol et la perméabilité en fonction de la distance à 2 h, et en fonction du temps à  $2,5 \mu\text{m}$  du bord. Les courbes corrigées par la résistance estimée du bouchon se superposent aux valeurs qui n'en tiennent pas compte. Effectivement, d'après le modèle proposé et pour  $x$  très petit ( $2,5 \cdot 10^{-6}$  m), il faudrait que la résistance soit plus grande d'environ cinq ordres de grandeur pour augmenter suffisamment la concentration au bord et corriger la dose d'inhibition d'un facteur  $10^5$ .

Dans la suite de ce projet, il nous faudra donc consolider la calibration de notre modèle et particulièrement les estimations de vitesse et de porosité. Nous y reviendrons en conclusion du chapitre. Nous allons pour l'instant conserver le modèle en l'état, en tenant compte de la résistance du poreux, et nous allons maintenant observer comment le modèle prédit les deux changements de conditions que nous avons expérimentés.

## 3.7 Prédictions du modèle

### 3.7.1 Prédictions du modèle lorsque le rinçage est augmenté

#### Ajustement et prédiction du modèle sur le taux temporel

Nous avons ajusté les paramètres d'entrée du modèle sur la condition contrôle avec une pression en entrée du système de perfusion à 120 kPa simultanément avec la condition test (300 kPa).

Pour ce contrôle, nous obtenons les paramètres suivants pour l'ajustement temporel au bord de la chambre, près des entrées ( $x = 2,5 \mu\text{m}$ ) :

- $\mu = 1,9$  h,
- $\sigma = 0,8$  h,
- $\frac{s}{C_{50}} = 9,4 \cdot 10^{-12}$  L/s,
- somme des résidus de l'ajustement : 0,003.

Nous utilisons ces paramètres pour tracer la prédiction de notre modèle lorsque la pression en entrée s'élève à 300 kPa, aucun autre paramètre n'est modifié.

Nous observons que le modèle prédit bien l'augmentation du taux d'induction au bord de la chambre jusqu'à environ 2 h. En revanche, la prédiction surestime la probabilité d'induire à plus forte densité de cellules 2 h après confluence (somme des résidus 0,097).

#### Ajustement et prédiction du modèle sur le taux spatial

En ajustant ces deux paramètres sur la condition contrôle correspondante le long de  $x$  nous obtenons :

- $\beta = 0,62$ ,
- $\frac{s}{C_{50}} = 1,3 \cdot 10^{-11}$  L/s,
- somme des résidus 0,0008.

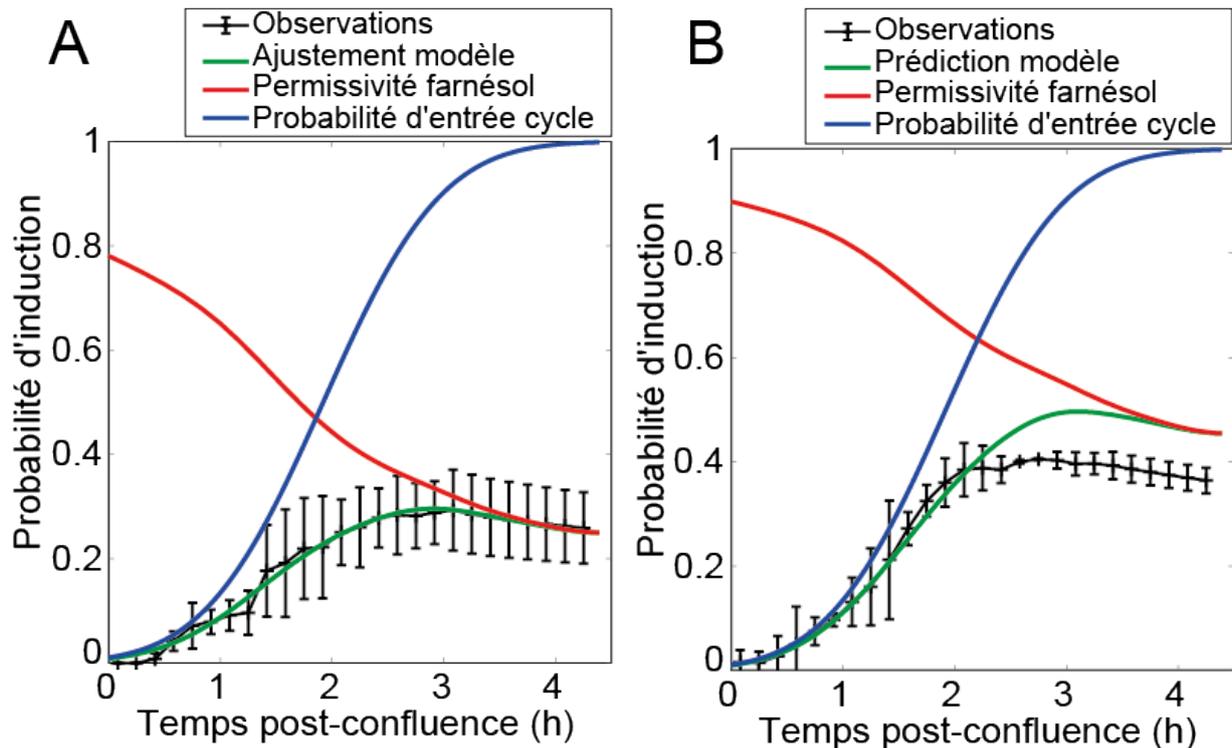


FIGURE 3.20 – (A) Ajustement des paramètres du modèle sur le taux d'induction temporel du contrôle. (B) Prédiction du modèle lorsque la pression appliquée au système de rinçage est augmentée 1,5 fois par rapport au contrôle.

La prédiction spatiale découlant de notre modèle (Fig. 3.21) suit bien la probabilité expérimentale à 2,5  $\mu\text{m}$  du bord lorsque le rinçage est augmenté (300 kPa). En revanche, cette prédiction surestime aussi le taux d'induction, lorsque la distance aux entrées augmente (somme des résidus 0,0215).

### Bilan sur la prédiction du modèle en augmentant le rinçage

Le modèle proposé explique donc en partie l'augmentation du taux d'induction lorsque la vitesse de rinçage augmente, limitant l'accumulation de farnésol endogène sous pression de croissance. Cependant, nous observons une surestimation de la permissivité du farnésol à la fois pour le profil spatial et temporel. Ce comportement du modèle trouve peut-être son origine dans une surestimation de l'augmentation de la vitesse moyenne dans le poreux avec l'augmentation de la pression imposée au milieu de rinçage.

En particulier, la surestimation de la prédiction spatiale serait compatible avec une augmentation de la résistance du poreux avec la pression imposée en entrée du système. En effet, le poreux étudié est compressible car il est constitué de cellules déformables. Sa porosité et sa résistance hydrodynamique dépendent donc peut être de la pression appliquée. Valencia *et al.* ont en effet observé que la résistance spécifique d'un poreux constitué de levures augmente d'environ 115% lorsque la pression est doublée [281]. Les auteurs suggèrent que ce type de poreux est très compressible avec un module de compressibilité estimé à 1,1.

Bien que la géométrie et le nombre de cellules constituant le poreux dans notre cas soient très différents, il est possible que cela explique en partie la surestimation de taux d'induction au centre

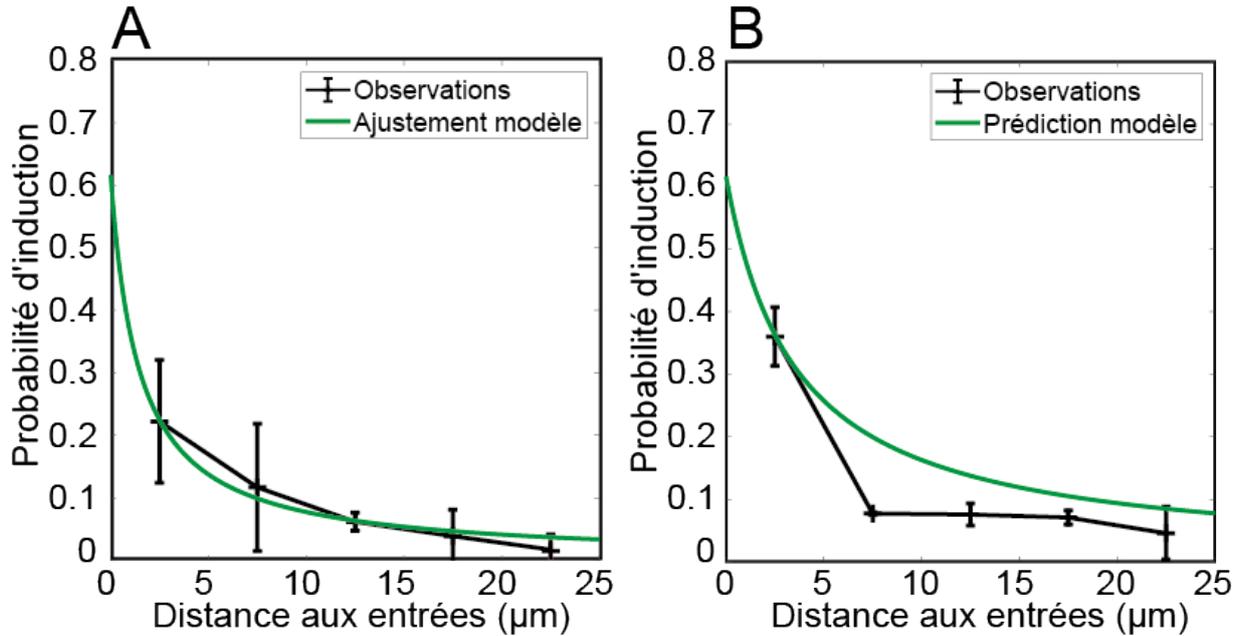


FIGURE 3.21 – (A) Ajustement des paramètres du modèle sur le taux d'induction spatial du contrôle. (B) Prédiction du modèle lorsque la pression appliquée au système de rinçage est augmentée 1,5 fois par rapport au contrôle.

de la chambre à 300 kPa, les cellules étant alors plus compactées contre leur voisines. De part ce comportement déformable, il est possible que ce phénomène soit d'autant plus marqué à forte densité de cellules (et donc aux temps longs après confluence), sur-prédisant alors d'environ 25% le taux d'induction temporel au bord. En premier lieu, il nous faudrait donc vérifier si la porosité de l'assemblée de cellules confinées varie avec la pression imposée au système.

### 3.7.2 Prédiction de l'augmentation du taux d'induction temporel lorsque le taux de sécrétion de farnésol est limité

#### Ajustement et prédiction du modèle sur le taux temporel

Nous ajustons cette fois le modèle sur le contrôle correspondant (une seule expérience avec pravastatine) et nous obtenons les valeurs suivantes :

- $\mu = 1,2$  h,
- $\sigma = 0,6$  h,
- $\frac{s}{C_{50}} = 4,0 \cdot 10^{-12}$  L/s,
- somme des résidus de l'ajustement : 0,005.

Tashiro *et al.* ont observé une diminution d'environ 70% de la quantité de farnésol sécrété à 24 h en ajoutant 64 µg/mL de pravastatine au milieu de culture [273]. Pour tracer la prédiction basée sur cette estimation, nous entrons les paramètres ajustés du modèle en retranchant 70% à la valeur ajustée du paramètre  $\frac{s}{C_{50}}$  pour simuler une limitation de la sécrétion. Le modèle prédit de manière très satisfaisante l'augmentation du taux expérimental d'induction au bord Fig. 3.22 (somme des résidus : 0,044).

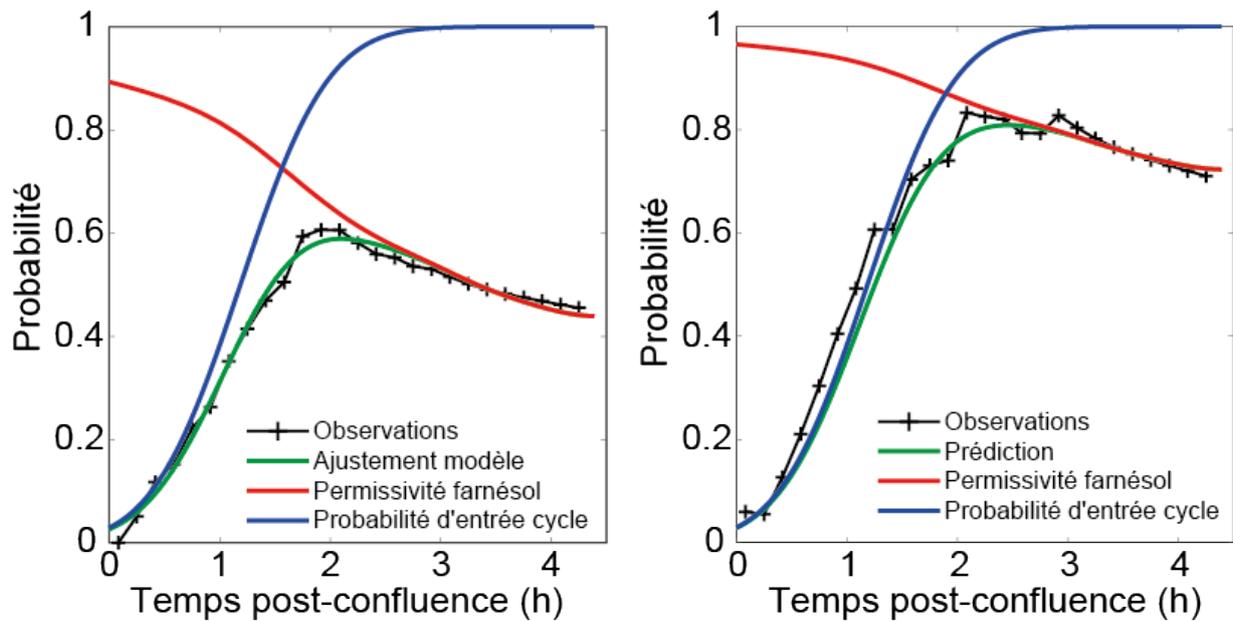


FIGURE 3.22 – (A) Ajustement des paramètres du modèle sur le taux d'induction temporel du contrôle. (B) Prédiction du modèle lorsque le taux de sécrétion de farnésol est diminué de 70% pour simuler l'ajout de pravastatine.

### Ajustement et prédiction du modèle sur le taux spatial

Nous avons effectué l'ajustement spatial en laissant  $\beta$  en paramètre de fit. Cependant, nous avons obtenu une valeur de 1,5 pour  $\beta$  que nous supposons pourtant borné entre 0 et 1 d'après la définition que nous en avons fait :

- $\beta = 1,5$ ,
- $\frac{s}{C_{50}} = 1,2 \cdot 10^{-11}$  L/s,
- somme des résidus 0,001.

Nous manquons encore de recul sur les prédictions du modèle, il faudrait répéter l'expérience pour vérifier si le  $\beta$  que nous estimons est dans les barres d'erreurs expérimentales. Le fait que ce pré-facteur soit supérieur à 1 pourrait provenir d'une mauvaise estimation de la dynamique spatiale des inductions qui serait artificiellement corrigée par ce pré-facteur lors de l'ajustement.

Nous procédons la même façon que pour l'ajustement temporel, en retranchant 70% de sa valeur à la sécrétion estimée par le modèle. Nous constatons que le modèle ne prédit pas de façon satisfaisante les observations expérimentales (résidus : 0,203) et surestime tous les points (Fig. 3.23).

Encore une fois, cette surestimation pourrait provenir d'une mauvaise évaluation du gradient de concentration le long de la largeur de chambre. De plus la concentration locale de pravastatine est aussi modulée par le transport en milieu poreux, ce que nous avons négligé dans cette étude. Il est aussi possible que la pravastatine soit assimilée par les cellules, accentuant sa déplétion. Il n'est donc pas très surprenant que le modèle surestime le taux d'induction spatial.

Nous avons réitéré la prédiction en diminuant cette fois de seulement 50% le taux de sécrétion estimé. La prédiction est alors satisfaisante et la somme des résidus s'élève à 0,017 (Fig. 3.24). Le modèle spatial reste donc compatible avec une diminution du taux de sécrétion relié à l'introduction de pravastatine dans le milieu de rinçage.

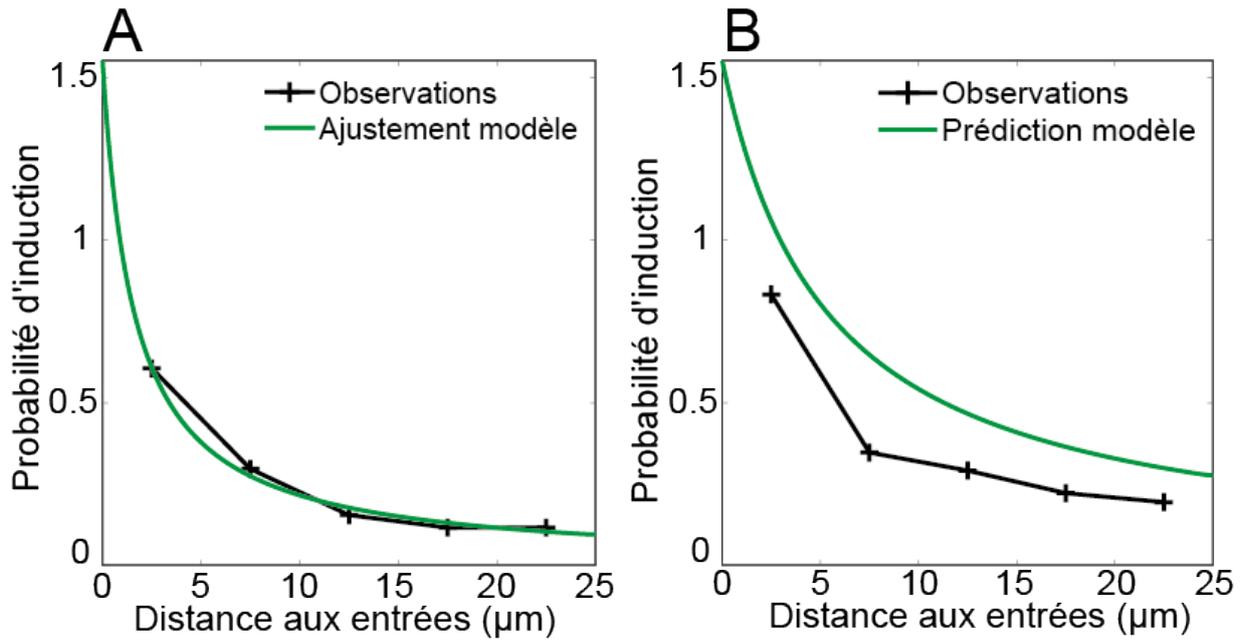


FIGURE 3.23 – (A) Ajustement des paramètres du modèle sur le taux d'induction spatial du contrôle. (B) Prédiction du modèle lorsque le taux de sécrétion de farnésol est diminué de 70% pour simuler l'ajout de pravastatine.

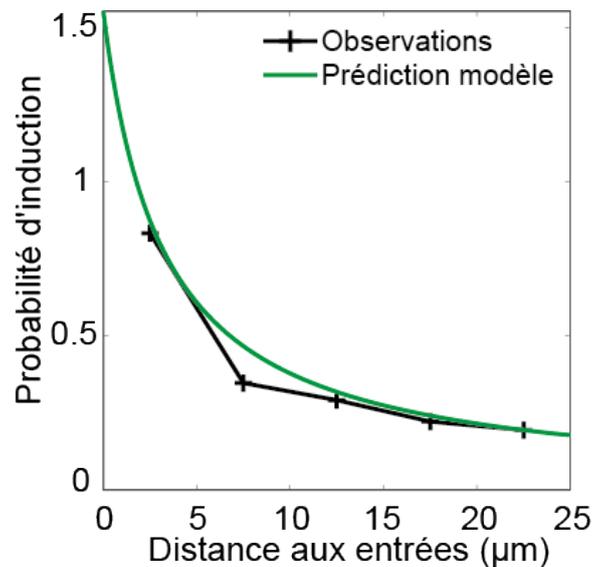


FIGURE 3.24 – Prédiction du modèle lorsque le taux de sécrétion de farnésol est arbitrairement diminué de 50% pour simuler l'ajout de pravastatine.

### 3.7.3 Bilan et limitations générales des prédictions du modèle

Dans les deux cas étudiés, la prédiction spatiale surestime la probabilité d'inductions lorsque la distance aux bords augmente. Etant donné que c'est également le cas pour la prédiction sur la pravastatine, pour laquelle nous ne modifions pas les paramètres de transport dans le poreux, il semble que notre modèle à une dimension ne soit pas entièrement adapté, ou que certaines hypothèses soient à revisiter.

Tout d'abord, nous négligeons l'aspect tri-dimensionnel du problème, nous nous attendons à ce que le module de vitesse diminue plus rapidement en considérant l'équation d'advection-diffusion dans un volume et non le long d'un seul axe. Cela pourrait expliquer cet écart entre prédiction et observation le long de la largeur de la chambre. Ensuite, nous avons supposé que la probabilité d'induire est uniquement gouvernée par le cycle cellulaire et le farnésol, nous avons également supposé que l'efficacité d'induction  $\alpha$  vaut 1.

Finalement, notre modèle propose une description simplifiée du phénomène biologique observé. Malgré les approximations faites, la prédiction temporelle suit de manière satisfaisante la dynamique d'induction observée au bord. Cependant, l'estimation de la concentration inhibitrice en farnésol issue du modèle nous paraît très faible, et devrait probablement être supérieure de plusieurs ordres de grandeurs. Un facteur de correction doit encore être apporté et pourrait trouver son origine dans le taux de sécrétion, dans la porosité et/ou dans la résistance hydrodynamique du poreux composé de levures déformables.

Dans la suite de ce projet, et si les écarts entre prédiction et observation se confirment une fois les aspects microfluidiques et cycle cellulaire calibrés, il serait intéressant d'explorer l'existence de voies biologiques pouvant être impliquées dans la répression de la transition sous pression de croissance.

## 3.8 Conclusion et perspectives

### 3.8.1 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié comment la pression de croissance module l'efficacité d'induction d'hyphes chez *C. albicans*. Nous avons observé l'initiation d'hyphes avec l'augmentation de la pression dans la population de cellules confinées malgré des paramètres physico-chimiques peu permissifs (30°C, pH5,5). Notre système microfluidique nous a permis de mettre en lumière un couplage complexe au sein de populations denses, entre un phénomène d'inhibition d'origine chimique, et l'activation des inductions, d'origine mécanique. En effet, nous avons observé que le taux d'induction pique, puis diminue avec l'augmentation de pression. Nous avons aussi vu que le nombre d'initiations chute rapidement avec la distance aux entrées de renouvellement de milieu. Des expériences complémentaires suggèrent que la molécule endogène de *quorum-sensing* farnésol est à l'origine du phénomène d'inhibition.

Nous avons proposé un modèle phénoménologique pour décrire la probabilité d'inductions dans une population dense sous pression de croissance avec renouvellement du milieu par du rinçage. Nous supposons que la probabilité est modulée dans le temps à la fois par la possibilité de réentrée dans le cycle sous pression de croissance, et par l'accumulation de farnésol avec l'augmentation de la densité de cellules. En fixant la probabilité d'induction par la mécanique comme une constante de la pression  $\alpha=1$  (soit  $\mathbb{P}_{\text{pression}} = \mathbb{H}_0(P)$ ), les prédictions du modèle sont compatibles avec les observations en modulant des paramètres expérimentaux appliqués. **Nos résultats suggèrent qu'en dehors de toute inhibition, l'efficacité d'induction par la mécanique est de 100% ( $\alpha=1$ ).**

Nous avons estimé la concentration locale de farnésol par un modèle 1D d'advection-diffusion en milieu poreux. Notre modèle surestime systématiquement le taux d'induction en fonction de la distance aux entrées, suggérant que nous décrivons encore mal les paramètres de transport moléculaire dans le poreux. En revanche, il est capable de prédire la probabilité temporelle d'inductions près des canaux de renouvellement de milieu, où le rinçage est le plus efficace. En particulier nous

sommes capables de prédire le taux d'induction au bord lorsque le taux de sécrétion de farnésol est modulé.

Enfin, **ces premiers résultats suggèrent que l'efficacité d'induction par la pression de croissance est aussi forte qu'un stress inductif connu tel que l'addition de sérum. Ils soulignent l'importance du couplage de deux phénomènes pouvant moduler l'initiation hyphale durant la croissance sous confinement : l'émergence de la pression induite par la croissance et l'accumulation de *quorum-sensing* endogène.**

Dans le chapitre suivant, nous nous intéressons à la dynamique d'expression du gène spécifique aux hyphes (*HWPI*) durant l'initiation et la maintenance hyphale sous pression. Par des mesures en *cellule-unique* nous observerons comment la pression de croissance module la force d'initiation, et la croissance hyphale.

### 3.8.2 Calibration et questionnement du modèle proposé

#### Mesures expérimentales et calibration

Notre modèle prédit bien la dynamique temporelle des inductions au bord de la chambre pour les conditions explorées. Cependant, nous avons vu que ce modèle a tendance à surestimer le taux d'induction à forte densité de cellules et au centre de la chambre. Nous avons émis de nombreuses hypothèses de simplification qui pourrait expliquer cette surestimation.

Ce modèle repose sur la mesure de la porosité, du nombre de cellules et de la pression de croissance. A court terme, il nous faudrait commencer par accumuler plus de mesures sur la relation entre nombre de cellules et pression de croissance. Pour l'instant nous n'avons évalué le nombre de cellules dans seulement quatre chambres exploitables et une seule expérience. Il faudrait une construction avec les noyaux marqués pour augmenter aisément la statistique (détection automatique) et consolider le modèle.

A long terme, il serait peut-être encore mieux d'évaluer simultanément la pression, le nombre de cellules et le nombre d'inductions **dans chaque chambre** et non de moyenner avec des expériences différentes. Enfin, nous avons calculé le taux d'induction comme "nombre d'inductions parmi la population **totale**". Il serait plus rigoureux de considérer non pas la population totale, mais la population **qui n'a pas induit**. Pour l'instant, nous mélangeons la population "hyphes" (non comptées comme "induction") et les levures dans notre "nombre total" de cellules.

Notre modèle repose sur la concentration locale de farnésol selon l'équation d'advection-diffusion à **une** dimension. Il serait intéressant d'étudier l'évolution de la vitesse et de la concentration locales dans des simulations d'éléments finis à 2 voire 3 dimensions. A une dimension, nous surestimons peut-être la vitesse locale dans le poreux. Nous négligeons aussi la géométrie 3D de notre dispositif, illustré 3.25.

Nous ne considérons que les cellules au bas de la chambre pour évaluer le transport et l'accumulation de farnésol. Or, il y a plusieurs niveaux de cellules le long de l'axe vertical, qui sécrètent aussi du farnésol. Ajoutons que les parois de PDMS sont déformées par la pression de croissance. Dans ce cas nous sous-estimons probablement la concentration de farnésol à distance des entrées. Enfin, la chambre en PDMS est "bombée" au centre à forte densité de cellules, ce qui devrait accentuer cet effet.

Ensuite, nous avons estimé que la résistance hydrodynamique du poreux est négligeable pour les valeurs de porosité mesurées par exclusion de fluorescence ( $\epsilon > 0,2$ ). Nous souhaitons vérifier la valeur de porosité dans notre système, en fonction de la pression de croissance, mais aussi en fonction de la force de rinçage imposée au système. Les levures forment un poreux **déformable**, il

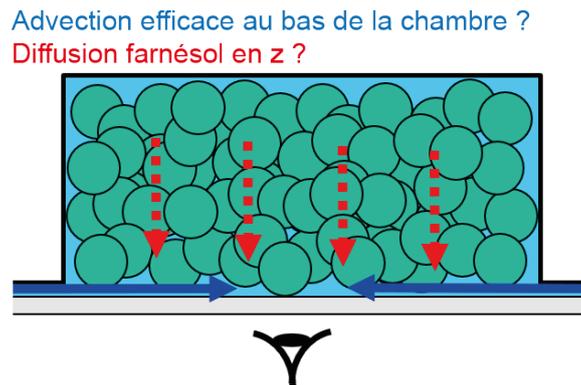


FIGURE 3.25 – Vue simplifiée du profil d'une puce remplie de cellules. Dans notre modèle, nous ne tenons pas encore compte de la sécrétion de farnésol par les cellules au-dessus du plan focal.

est donc possible que la porosité ne soit pas homogène dans la chambre et que de plus elle varie avec la force de rinçage appliquée.

Pour éviter que le Dextran ne soit progressivement adsorbé dans les cellules, faussant les mesures d'exclusion de fluorescence, nous pourrions ajouter ce fluorophore au milieu perfusé à différentes pressions de croissance et imager immédiatement les chambres. Comme souligné dans ce chapitre, l'approximation de Kozeny-Carman (que nous avons utilisé pour calculer la résistance hydrodynamique du poreux en fonction de la porosité) est adaptée dans le cas de sphères non déformables mono-dispersées. Afin d'évaluer la validité de cette estimation nous allons par la suite mesurer expérimentalement la variation de la résistance hydrodynamique aux bornes de nos puces à l'aide d'un débitmètre.

### Quels mécanismes biologiques pourraient moduler l'induction dans notre système ?

Dans cette première étude, nous avons émis l'hypothèse que l'efficacité d'induction d'hyphes par la mécanique est de 100%. Pour rappel, cette hypothèse se traduit par le terme " $\alpha$ " que nous avons supposé nul à pression nulle, et valant 1 à pression de croissance positive. Il est possible que cette quantité soit inférieure à 1 ou dépende en réalité du module de force mécanique appliqué, via l'intégration du signal par des voies biologiques. Dans la suite de ce projet il serait donc intéressant d'étudier l'impact des différentes voies biologiques sur ce facteur  $\alpha(P)$ , plus particulièrement, de trouver une mutation pour laquelle  $\alpha(P)$  devient nul. Cela suggérerait alors que la protéine délétée est impliquée dans l'induction levure vers hyphes sous pression de croissance.

D'après les travaux précédemment réalisés par Delarue *et al.* nous avons commencé par interroger le rôle de la protéine Msb2 dans la survie sous pression de croissance chez *C. albicans*. L'expérience réalisée chez *S. cerevisiae* et ses implications sur la survie cellulaire sous pression ont été présentées en introduction. Premièrement, nous n'avons observé que quelques cellules lysées par chambre sous pression de croissance dans le cas de la souche sauvage (données à quantifier). En revanche, la survie des cellules sous pression diminue dramatiquement lorsque le gène *MSB2* est supprimé. Sur deux répliques biologiques, nous avons décompté environ 40% de cellules lysées après 20 h sous confinement. Ce résultat est compatible avec les observations faites par Delarue *et al.* chez *S. cerevisiae* [76]. Deux exemples typiques sont montrés figure 3.26.

Cependant, avec cette construction nous ne pouvons pas déterminer aisément si les cellules ont d'abord induit des hyphes passée la confluence avant d'être lysées sous plus forte pression de croissance. Il serait donc intéressant d'explorer le rôle de différentes protéines du mur et voies

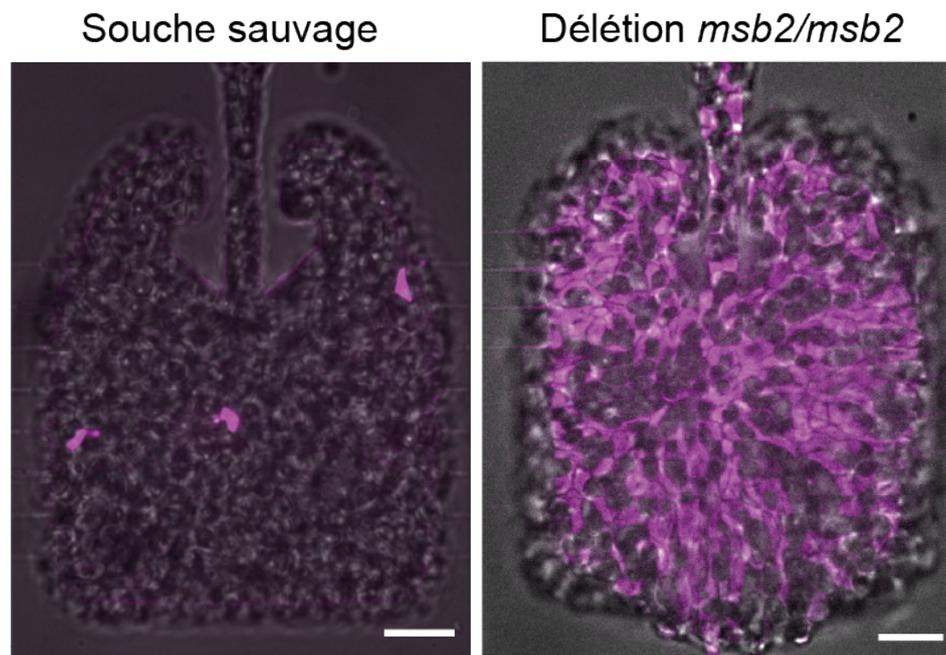


FIGURE 3.26 – La protéine Msb2 est nécessaire à la survie sous pression induite par la croissance chez *C. albicans*. Superposition d'images de chambres 20 h après l'inoculation de cellules, en champ clair et en fluorescence. Les débris de cellules lysées sont visibles en fluorescence. À gauche, la souche sauvage et à droite la construction *msb2* $\Delta/\Delta$ .

de signalisation, dans l'intégration du stress mécanique de pression de croissance et l'induction d'hyphes. Nous avons déjà à disposition quelques constructions candidates (*msb2/msb2*, *dfi1/dfi1*, *wsc1/wsc1* notamment) fournies par Sophie Bachellier-Bassi (Institut Pasteur) pour lesquelles il faudrait ajouter un rapporteur de croissance hyphale. Une partie de ces souches comportant le rapporteur nous a récemment été fournie par le groupe de H. Liu (Université d'Irvine, Etats-Unis) dans le cadre d'une collaboration.

Un autre aspect que nous n'avons pas encore étudié est le stress en cisaillement dans notre système microfluidique. En effet, une autre hypothèse que nous pourrions explorer est que le stress de cisaillement dû au rinçage de milieu favorise l'induction. Nous estimons le stress en cisaillement au bas de la chambre à 0,2 Pa lorsque le débit entrant est de 0,16 nL/s. C'est environ dix fois moins que celui estimé dans les vaisseaux sanguins (~ 2 Pa) [221]. *Candida* est capable de former des biofilms, composés en partie d'hyphes, sur des cathéters insérés dans les vaisseaux sanguins de patients. Plusieurs études citées en introduction suggèrent que l'une des premières étapes de formation d'un biofilm passe par l'adhérence au substrat. Ce mécanisme repose notamment sur différentes protéines du mur de la famille des adhésines (Hwp1, les Als, Eap1) [204].

Or, plusieurs expériences de l'équipe de Y.F Dufrêne [119, 98] montrent que ces protéines comportent une séquence de type amyloïde. Ces domaines spécifiques forment des liaisons homophiliques<sup>5</sup> et engendrent des agrégats lorsqu'une force mécanique suffisante est appliquée. Plusieurs études montrent la formation de ces agrégats non seulement par stimulation mécanique avec une pointe AFM ou une autre cellule [71], mais aussi en appliquant une contrainte en cisaillement par advection de liquide autour des cellules [52, 8]. Les auteurs proposent alors un lien entre la dynamique de formation de biofilms de *Candida* et l'application de forces mécaniques, notamment

5. Liaisons entre deux molécules identiques

de cisaillement. Cependant, le rôle de la formation de tels agrégats dans l'efficacité de transition levure vers hyphe n'a pas encore été directement montré à notre connaissance.

Une hypothèse intéressante serait que la formation et l'accumulation d'agrégats de protéines à domaines amyloïdes avant l'arrivée à confluence rendent les cellules plus "mécanosensibles" et favorisent la formation d'hyphes.

### **3.8.3 Probabilité d'induction après relaxation de la pression**

#### **Observation d'inductions partout dans la chambre suite à la relaxation de la pression de croissance**

Tout au long de ce chapitre, nous avons étudié l'impact de l'augmentation de la densité de cellules (pression de croissance, accumulation de farnésol) sur la probabilité d'induction. Nous avons également à notre disposition des chambres qui permettent de relaxer stochastiquement la pression. Le principe de ces chambres repose sur le comportement granulaire des assemblées denses de cellules confinées spatialement, il est détaillé dans l'étude de Delarue *et al.* citée en introduction [74], et nous en présentons les limitations chez *C. albicans* dans le Matériel et Méthodes.

Nous avons pu observer une relaxation brutale de la pression de croissance pour quelques chambres, lorsqu'une part importante de cellules en est expulsée. Dans l'exemple (Fig. 3.27-A) la pression de croissance avant la relaxation a atteint  $\sim 1$  MPa en environ 5 heures. En cinq minutes, les chaînes de forces entre cellules se relâchent et des dizaines de cellules sont expulsées hors de la chambre du fait du comportement élastique de l'environnement mécanique (cellules, parois de PDMS). La pression dans la chambre diminue alors de 90% (100 kPa). Nous avons remarqué l'apparition de nouvelles inductions hyphales dans les 10 minutes qui suivent la relaxation et la ré-augmentation de pression progressive. Ces nouvelles inductions se répartissent sur les trois heures qui suivent et que nous avons pu imager. De plus, ces inductions semblent uniformément réparties dans la chambre (Fig. 3.27-A, à 8 h, et Fig. 3.27-B, distance aux entrées).

Notre modèle prédit deux mécanismes que nous souhaiterions explorer dans la suite de ce projet :

- la relaxation passe par l'expulsion de cellules, cette expulsion pourrait s'accompagner d'un renouvellement important de milieu contenu dans la chambre, rinçant le farnésol accumulé. Alors l'environnement chimique redevient plus permissif aux inductions. Nous nous attendons à une répartition uniforme des inductions juste après la relaxation, à gradient de farnésol faible le long de la largeur de chambre.
- la probabilité d'induction de la population dépend de la probabilité de réentrée dans le cycle cellulaire. Si la pression de croissance augmente la durée du cycle cellulaire comme chez *S. cerevisiae* [76], alors nous attendons une dynamique temporelle d'induction différente après relaxation.

Ces deux hypothèses rejoignent les observations évoquées en introduction : il semble que l'efficacité de transition augmente lorsque la population est inoculée dans un milieu "inductif" depuis une culture à très forte densité cellulaire. Ces études suggèrent d'une part une modulation liée au rinçage soudain du farnésol, et d'autre part à la réentrée dans le cycle d'une population synchronisée en phase stationnaire. **Est-ce qu'une telle synchronisation de la population est observable sous pression de croissance?**

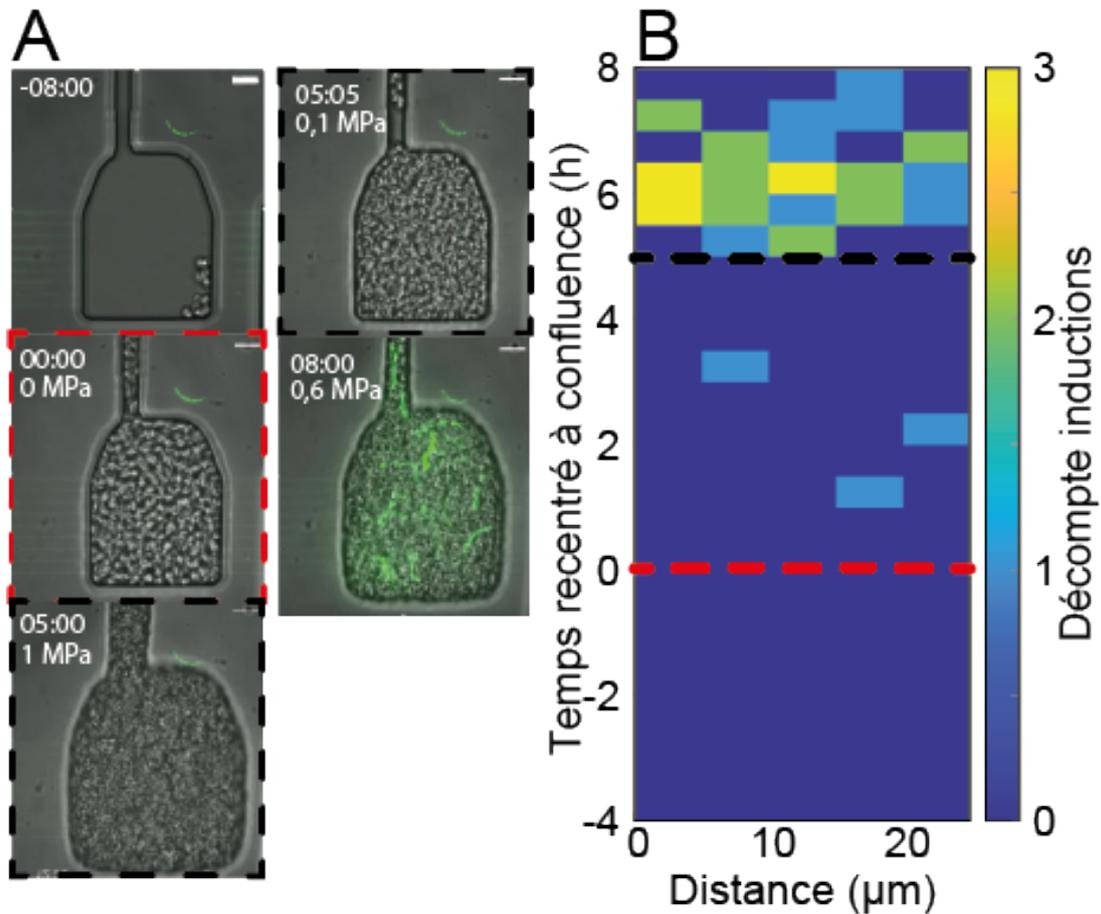


FIGURE 3.27 – (A) Image en champ clair et en fluorescence d'une chambre pour laquelle la pression de croissance atteint progressivement les 1 MPa avant d'être stochastiquement relaxée à 100 kPa. Nous pouvons voir des hyphes dans la chambre (expression de GFP par la construction  $P_{HW1}$ -GFP) dans les heures qui suivent la relaxation. (B) Histogramme spatio-temporel du décompte des inductions. En rouge, l'instant d'arrivée à confluence de la chambre illustrée, en noir l'instant de relaxation de la chambre.

### Les cellules *C. albicans* s'accumulent en $G_1$ du cycle cellulaire sous pression

Pour interroger cette hypothèse, nous avons étudié l'impact de la pression de croissance sur les phases du cycle cellulaire chez *C. albicans*. Nous allons voir que la phase du cycle cellulaire  $G_1$  semble particulièrement impactée comme observé précédemment chez *S. cerevisiae* [76]. Pour cela nous inoculons les chambres microfluidiques avec une construction Tub2-GFP développée par le groupe de J. Berman [94]. Cette construction nous permet d'observer la dynamique de polarisation des microtubules des cellules. Ces structures en filaments composent le fuseau mitotique permettant l'organisation des chromosomes le long du cycle cellulaire. L'aspect des microtubules indique ainsi dans quelle phase du cycle se trouve la levure observée (Fig. 3.28-A).

Comme chez *S. cerevisiae*, nous observons que la proportion de cellules se trouvant dans la phase  $G_1$  du cycle est doublée et devient majoritaire sous pression (Fig. 3.28-B). Les études citées en introduction suggèrent que l'arrêt dans cette phase précoce du cycle augmente les chances de survie des cellules sous contraintes compressives en prévenant la croissance polarisée, source d'instabilité mécanique [76, 198].

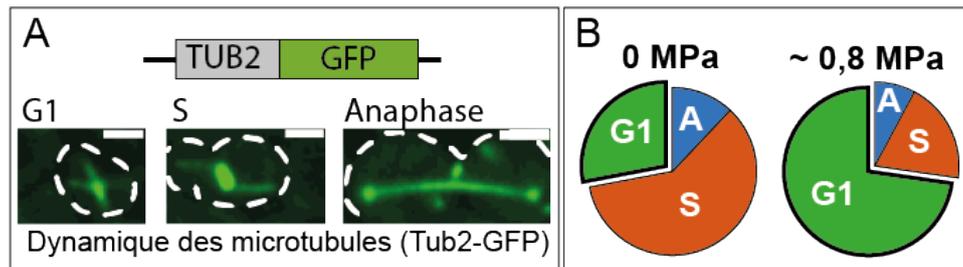


FIGURE 3.28 – (A) Schéma de la construction utilisée [94] Tub2-GFP permettant de déduire la phase du cycle des cellules. Lorsque la cellule est en interphase (G<sub>1</sub>) les microtubules forment un aster. Il y a aussi de nombreux fragments dans le cytoplasme (appelés "microtubules libres" dans l'étude de Finley *et al.* [94]). Lorsque le bourgeon émerge puis que l'ADN est dupliqué (S), les microtubules s'organisent autour des deux complexes mitotiques (*spindle-pole body*), évoqués en introduction (1.3.1). Lorsque la fin du cycle de division approche, la cellule entre en anaphase et le fuseau mitotique s'allonge de manière caractéristique. (B) La proportion de cellules en interphase G<sub>1</sub> passe de ~ 30% à ~ 60% sous pression induite par la croissance (N ≥ 50).

Ainsi, la pression de croissance module la proportion de cellules en G<sub>1</sub> et synchronise la population. Les paramètres  $\mu$  et  $\sigma$  de notre modèle décrivent la probabilité d'entrée dans le cycle sous stimulus mécanique. Nous supposons que ces deux paramètres diminuent avec la proportion de cellules synchronisées en G<sub>1</sub>. Ainsi, lorsque la pression est relaxée et que les réentrées dans le cycle sont permises, la probabilité d'induire devrait augmenter plus rapidement que dans le cas des populations asynchrones en début d'expérience.

La déduction de la phase du cycle avec la construction *Tub2-GFP* peut s'avérer fastidieuse. Afin de caractériser la modulation du cycle plus aisément, nous avons tenté de construire la souche *Nrm1-GFP* [218] avec l'aide de Sophie Bachellier-Bassi (Institut Pasteur). J'ai pu ainsi être formée aux protocoles de transformations génétiques pour les levures. Cependant les transformations génétiques chez *Candida* ont une efficacité plus faible que chez *S. cerevisiae* et nous n'avons pas encore obtenu de résultat positif dans notre laboratoire.



## Chapitre 4

# Impact de la pression de croissance sur l'initiation et la maintenance hyphale

### 4.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la compression mécanique issue de la croissance sous confinement spatial module l'induction hyphale dans la population de cellules. Ces inductions sont bornées temporellement sur une période compatible avec le cycle-cellulaire. Quel est l'impact de la compression mécanique sur la dynamique moléculaire durant l'initiation et la maintenance? Nous avons vu dans l'introduction que la phase d'initiation est une étape critique et temporaire durant laquelle des gènes associés aux hyphes commencent à être exprimés. La population n'étant pas synchronisée, nous proposons de revenir à des mesures sur cellules-unicques pour caractériser la dynamique d'expression du gène *HWPI* avec la construction  $P_{HWPI}$ -*GFP* sous compression mécanique.

Nous nous appuyerons sur les méthodologies présentées dans la partie 2.3.2 pour accéder aux taux de dégradation, de production, et à la durée de transcription de *HWPI* durant la phase d'initiation. Ensuite, nous présenterons la dynamique d'expression des cellules apicales d'hyphes. Nous verrons que la vitesse de croissance et le taux d'expression sont limités sous pression. Nous détaillerons l'impact de la pression induite par la croissance sur chacun de ces paramètres par rapport à un autre promoteur non-spécifique aux hyphes. Finalement, nous verrons que l'impact de la pression sur la croissance des morphotypes levure et hyphe est compatible avec une augmentation de l'encombrement intracellulaire, qui limiterait la biosynthèse de protéines.

### 4.2 Dynamique d'expression du rapporteur durant l'initiation sous pression de croissance

#### 4.2.1 L'expression du rapporteur est temporaire sous pression de croissance

Pour étudier la dynamique d'expression du gène *HWPI* durant la phase d'initiation sur cellule-unique nous effectuons des mesures manuelles d'intensité de fluorescence. Le principe de mesure est identique à celui utilisé dans le chapitre 2. Les mesures sont faites à partir d'images en fluorescence en microscopie confocale, afin de distinguer les contours des cellules dans la population dense (Fig. 4.1).

Nous remarquons que l'intensité de fluorescence de toutes les cellules observées augmente puis diminue sous pression (Fig. 4.2-A), contrairement à ce qui a été observé dans du milieu sup-

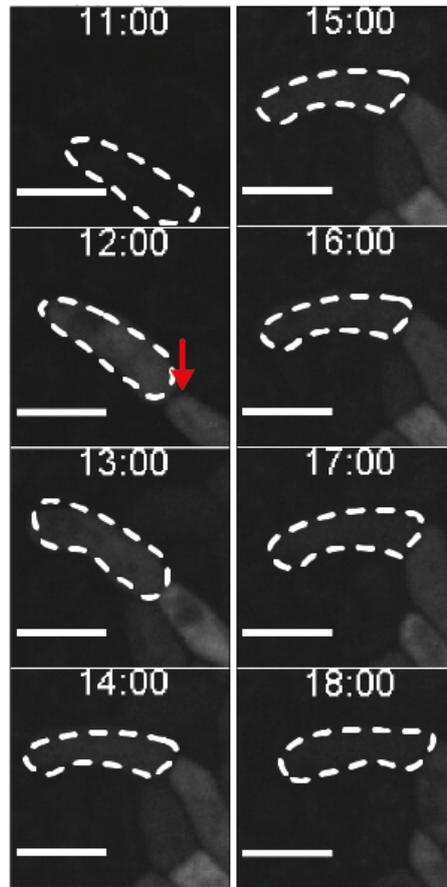


FIGURE 4.1 – Image en fluorescence d'une levure initiant l'expression de protéines fluorescentes sous le promoteur de *HWPI* dans une population dense en croissance sous confinement spatial. La cellule est entourée en pointillés lorsque l'intensité est trop faible pour être distinguée avec le contraste de l'image. La flèche rouge marque une septation. Échelle 5  $\mu\text{m}$ .

plémenté en sérum à 37°C. Notons que les mesures d'intensité sont réalisées sur plusieurs heures (3 à 6 h), période durant laquelle les cellules cyclent. La dynamique n'apparaît pas significativement différente entre les cellules qui débutent l'expression de *HWPI* à faible pression (inférieure à 50 kPa, en rouge) et les cellules qui induisent à des pressions supérieures à 200 kPa (en bleu). Les courbes semblent cependant plus dispersées à faible pression. Ces courbes d'intensité suggèrent que le promoteur de *HWPI* devient inactif passé un délai  $\Delta t$ . Nous allons donc ajuster les taux de dégradation d'ARN messagers ( $k_{dm}$ ) et de protéines ( $k_{dp}$ ), le taux de production effectif ( $k_{p-eff}$ ) et la durée d'activation du promoteur ( $\Delta t$ ) à partir du même modèle que celui présenté dans le chapitre 2. Pour rappel, ce modèle repose sur le système d'équations différentielles suivant :

$$\begin{cases} \dot{m} = k_{pm} \times u(t) - k_{dm} \times m \\ \dot{p} = k_{pp} \times m - k_{dp} \times p \end{cases}$$

Nous émettons l'hypothèse que chacun des taux (dégradation et production) sont des paramètres constants sous pression par cellule une fois l'initiation engagée. Un exemple de l'ajustement du modèle pour deux courbes d'intensité de fluorescence est donné figure 4.2-B.

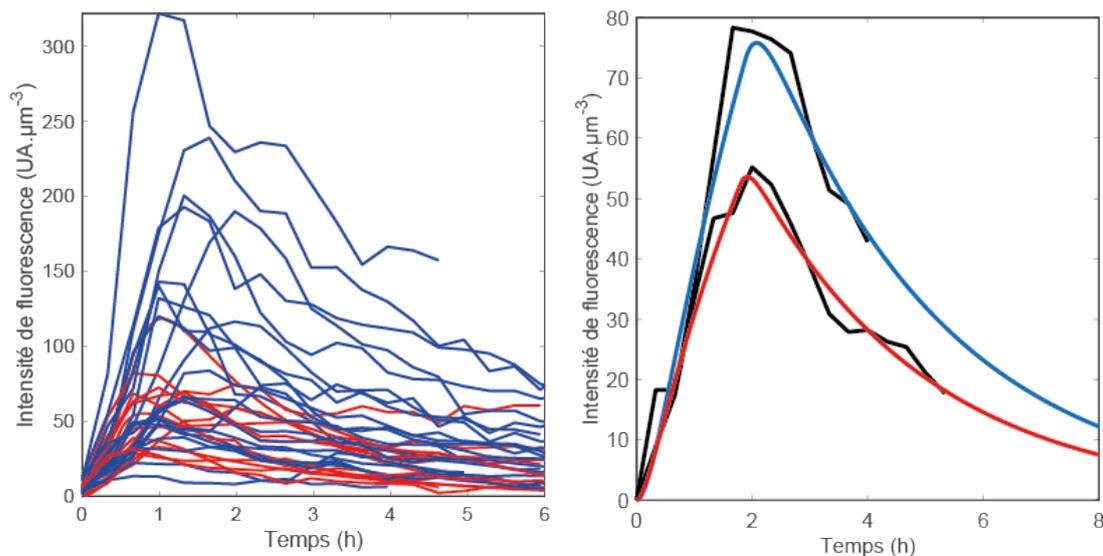


FIGURE 4.2 – (A) Intensité de fluorescence par cellule au cours du temps durant la croissance sous confinement spatial (chaque courbe correspond à une seule cellule). En rouge, l'intensité des cellules dont l'initiation débute à moins de 50 kPa, en bleu les cellules qui ont débuté l'expression de GFP à des valeurs de pression supérieures à 200 kPa. Les données sont plus dispersées à faible pression. (B) Chaque courbe est ajustée par la fonction  $p(t) \propto I(t)$  qui découle du modèle proposé.

#### 4.2.2 Pas de variation des taux de dégradation avec la pression de croissance

Le taux de dégradation des ARN messagers est supérieur à celui observé dans le cas du chapitre 2, et vaut  $5,59 \pm 2,39 \text{ h}^{-1}$ , les valeurs sont très dispersées mais restent compatibles avec la littérature. Pour les protéines, on retrouve qu'à 0 kPa, le taux de dégradation vaut environ  $0,40 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$ , ce qui est l'ordre de grandeur du taux de dilution, qui est compris dans ce terme (Fig. 4.3-B). Les deux taux de dégradation n'augmentent pas significativement sur la gamme de pression de 0 à 300 kPa. Ce résultat est à moduler par le fait que le taux de croissance moyen de la population (et donc la dilution) diminue sous pression. Nous y reviendrons en conclusion de ce chapitre.

#### 4.2.3 Modulation de la fenêtre temporelle et du taux de production sous pression de croissance

La durée de la fenêtre de transcription est de l'ordre d'un cycle cellulaire (environ 1 heure) à faible pression. Elle diminue avec la pression entre 0 et 200 kPa ( $p\text{-value} = 0,0065$ ) ce qui suggère que l'inactivation du promoteur est modulée sous pression dans la population dense (Fig. 4.4-A). Cette modulation trouve peut-être son origine dans la répression par des voies de signalisation mécanosensibles, ou encore via la présence de farnésol accumulé dans la population dense comme déjà évoqué dans le chapitre précédent.

En effet, nous avons vu dans la partie 1.2.1 de l'introduction (Fig. 1.11-A) que le répresseur de la transition levure-hyphale Nrg1 libère temporairement les sites d'activation de gènes associés aux hyphes, dont *HWP1*. Or, l'étude de Lu *et al.* [176] citée en introduction suggère que la dynamique avec laquelle Nrg1 revient à un niveau nominal est modulée par la présence (ou l'absence) de stimuli extracellulaires. D'autre part ce résultat est compatible avec celui obtenu dans le chapitre précédent, dans lequel nous avons observé que passé un certain délai sous pression, il n'y a plus

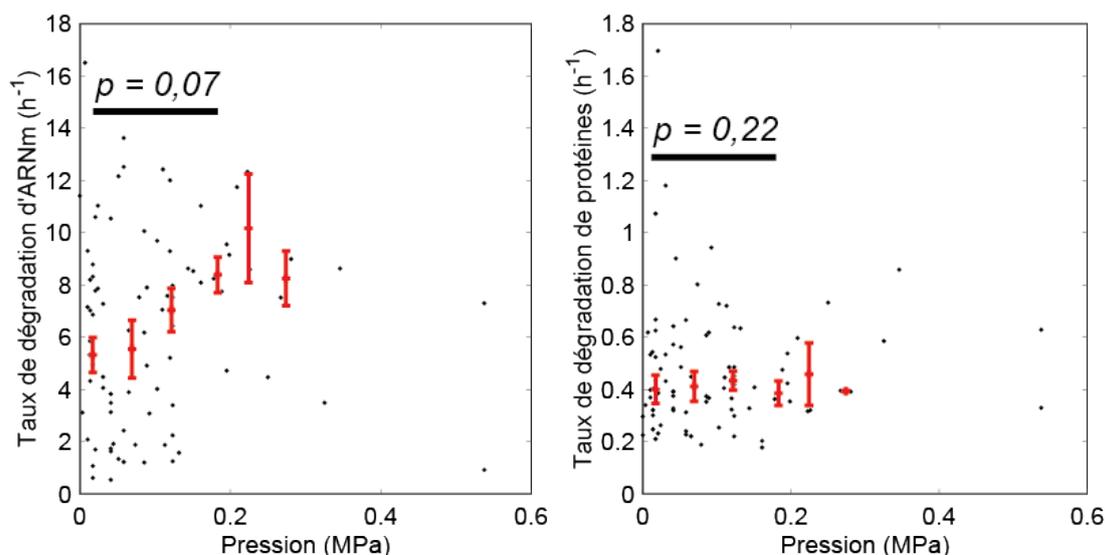


FIGURE 4.3 – (A) Le taux de dégradation d'ARN messagers (comportant la dilution) a tendance à augmenter avec la pression, mais ce n'est pas significatif. (B) Le taux de dégradation (comportant la dilution) de protéines ne varie pas significativement avec la pression. (N = 86, 3 réplicas biologiques indépendants)

de nouvelle induction de cellules hyphales. Cela suggère que la fenêtre d'opportunité de morphogénèse devient trop réduite pour permettre l'expression stable de gènes associés aux hyphes.

Nous observons en parallèle que le taux de création effectif de protéines est constant et ne varie pas significativement avec la pression (Fig. 4.4-B). Ce résultat suggère *a priori* que la force d'activation du promoteur n'est pas modulée par la pression contrairement à la durée de la fenêtre de transcription. Nous allons revenir sur ce résultat et vérifier cela par rapport à un autre promoteur dans la suite de ce chapitre.

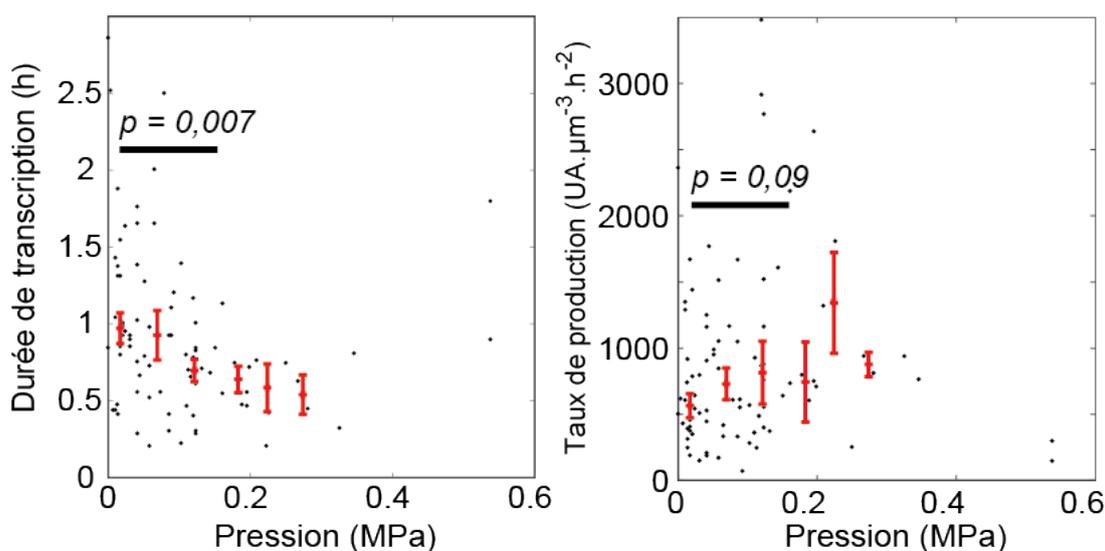


FIGURE 4.4 – (A) La durée d'activation du promoteur de *HWP1* durant l'initiation diminue avec la pression moyenne dans la chambre microfluidique. (B) Le taux de création effectif de protéines fluorescentes ne varie pas significativement entre 50kPa et 300 kPa. (N = 86, 3 réplicas biologiques)

Dans cette étude, nous obtenons peu de points de mesures de dynamique d'expression sous forte pression. De plus, les paramètres sont dispersés ce qui rend difficile l'établissement d'une tendance à partir d'un échantillon d'une centaine de cellules. Il serait intéressant d'observer l'impact de la pression sur la dynamique d'expression de *HWPI* en induisant des hyphes avec d'autres stimuli (facteurs chimiques comme du sérum, ou la N-acétylglucosamine par exemple).

Il s'agit de laisser les cellules développer de la pression de croissance, puis de changer le milieu perfusé avant d'observer les inductions éventuelles d'hyphes. Bien que les voies de signalisation soient probablement différentes, cela permettrait d'évaluer si la force d'activation du promoteur est effectivement modulée selon l'intensité de la contrainte mécanique de compression (et l'accumulation de farnésol).

De plus, connaissant l'instant précis auquel nous soumettons les cellules au stimulus chimique inductif, nous aurions accès à une information supplémentaire : le délai d'activation du promoteur. Alric *et al.* ont en effet observé que le délai d'activation (temps d'induction) de *ADH2*<sup>1</sup> est modulé sous pression chez *S. cerevisiae*.

## 4.3 Impact de la pression sur la maintenance de la croissance hyphale

### 4.3.1 Principe de la mesure et résultats bruts

Dans la partie 2.1, nous avons observé que l'expression du rapporteur que nous utilisons augmente avec la croissance des cellules apicales d'hyphes. Nous avons proposé que cette dynamique correspond à l'entretien du programme de croissance hyphale décrit dans l'introduction dans la partie 1.2.1. Nous allons vérifier que cette tendance est conservée lorsque les hyphes sont soumis à une forte compression mécanique dans des populations denses.

Nous mesurons l'aire et l'intensité de fluorescence des cellules apicales au cours du temps comme illustré sur la figure 4.5. Nous remarquons que l'hyphe est déformé dans cet environnement dense. Notons également qu'après la septation à 13 h 00 (flèche rouge) la cellule ne semble plus augmenter en aire apparente suggérant un arrêt de la croissance.

Nous remarquons que la croissance semble linéaire pour chaque cellule apicale, et qu'elle est de plus en plus lente d'une cellule à l'autre, à mesure que la pression augmente dans la chambre (Fig. 4.6-A). A forte pression, nous voyons que la dernière cellule apicale caractérisée semble avoir stoppé sa croissance et l'aire mesurée est constante. Ce résultat contraste avec celui observé dans le chapitre 2 dans lequel nous observions une augmentation régulière de l'aire au cours du temps en croissance libre. En parallèle, l'intensité de fluorescence augmente dans le cas des premières cellules apicales, puis diminue sous plus forte pression (Fig. 4.6-B).

Nous utilisons pour cette étude la même méthodologie que celle présentée dans le premier chapitre (partie 2.4). Nous calculons d'abord la vitesse de production apparente  $\partial_t I$  (Fig. 4.7-A), puis nous corrigeons cette valeur en rajoutant le taux de dilution de chaque cellule, qui est proportionnel au taux de croissance  $\frac{d_t A}{A} I(t)$  pour obtenir un taux de production net  $k_{p-net}$ . Chaque pente  $\partial_t A$  et  $\partial_t I$  est ajustée par une régression linéaire sur trois points pour un intervalle de temps

---

1. Le promoteur de *ADH2* est actif en conditions limitantes en glucose. Les auteurs ont observé l'expression de cette protéine en perfusant des chambres parvenues à différentes pressions avec du milieu privé de glucose, en utilisant la construction *P<sub>ADH2</sub> - mCherry*

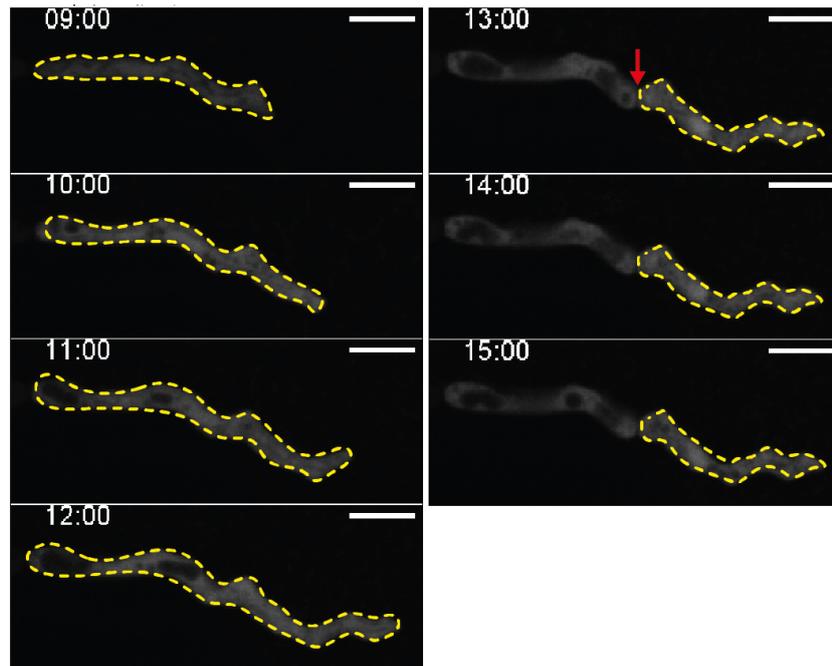


FIGURE 4.5 – Croissance d'un hyphe sous compression mécanique induite par la prolifération sous confinement. La surface considérée à chaque pas de temps est entourée en pointillés. Échelle 5  $\mu\text{m}$ .

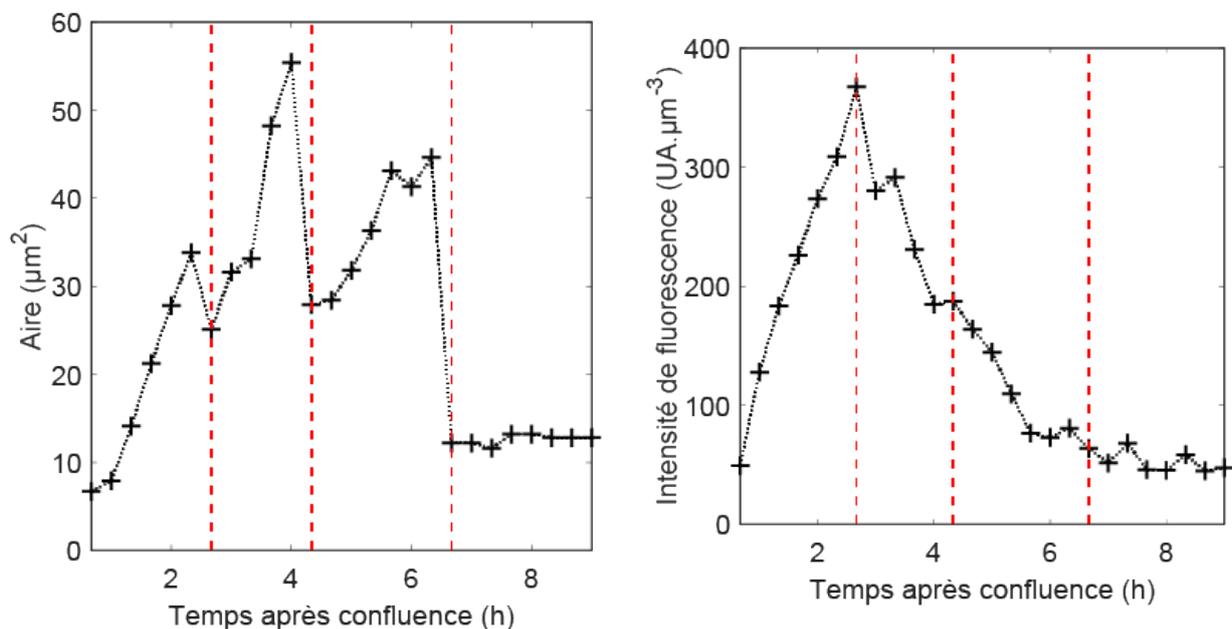


FIGURE 4.6 – (A) Variation de l'aire mesurée par cellule apicale au cours du temps sous compression mécanique induite par la prolifération. (B) Variation de l'intensité moyenne de fluorescence pour chaque cellule apicale correspondante au cours du temps. Les septations (divisions cellulaires) sont indiquées par les barres verticales rouges.

de 1 h.

### 4.3.2 La pression limite le taux de production de Hwp1 et la croissance apicale des hyphes

Le taux de production net de protéines, corrigé par la dilution, augmente avec la vitesse d'expansion comme c'est le cas sous la condition d'induction dans du sérum à 37°C (Fig. 4.7-B). Lorsque la croissance est inférieure à  $5 \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , le taux de production net devient négatif ce qui indique que la dégradation de protéines domine.

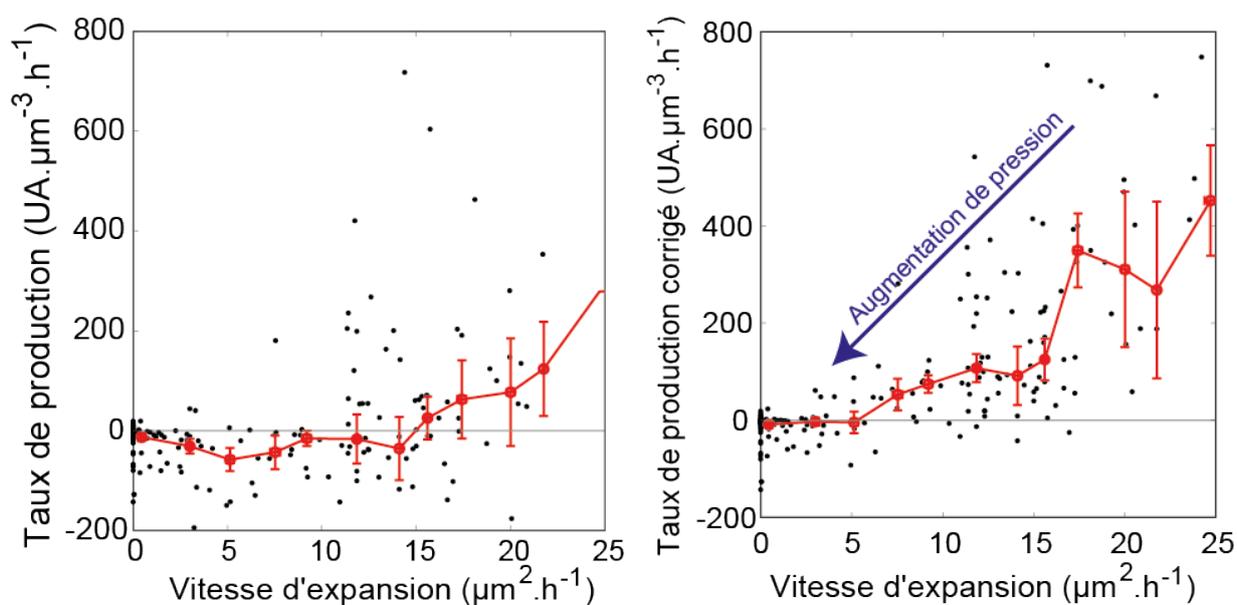


FIGURE 4.7 – (A) Variation de la vitesse de production de GFP en fonction de la vitesse d'expansion des cellules apicales d'hyphes. (B) Variation du taux de production net de GFP corrigé par la dilution pour chaque cellule, en fonction de la vitesse d'expansion. Ce taux de production augmente avec la vitesse de croissance. (N = 44, 2 réplicas biologiques)

La vitesse d'expansion médiane à pression nulle est inférieure d'environ 30% à celle obtenue dans du sérum à 37°C ( $19 \pm 1,6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ ) ce qui est attendu étant donné l'écart de température entre les deux expériences. Elle diminue avec la pression moyenne dans la chambre (Fig. 4.8-B) et de nombreux points de mesures tombent à zéro à partir de  $\sim 400$  kPa. Cette observation est compatible avec l'étude de Puener *et al.* [234] évoquée en introduction (1.4). Cette étude montre en effet que la vitesse d'extension hyphale diminue avec le module d'élasticité du substrat de PDMS envahi, et que 80% des hyphes deviennent incapables d'envahir le PDMS lorsque le module d'élasticité dépasse les  $\sim 300$  kPa.

Le taux de production nominal (à 0 kPa) est de l'ordre de  $220 \text{UA} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  ce qui est bien plus faible (Fig. 4.8-A), par rapport à celui mesuré en utilisant du sérum ( $1400 \text{UA} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ). La diminution du taux de production nominal indique que la force d'expression dépend des stimuli appliqués. En effet, les conditions physico-chimiques de pH et la composition du milieu utilisés dans ces expériences sont plutôt répressives à la croissance hyphale (pH 5,5 dans un milieu riche en glucose). De plus la température de croissance est de seulement 30°C et non 37°C ce qui contribue à limiter la dynamique de l'ensemble des réactions au sein de chaque cellule. Les forces mécaniques émergentes de la croissance couplées à ces conditions physico-chimiques permettent la croissance des hyphes, mais avec une efficacité relativement faible par rapport à des conditions plus classiques et favorables.

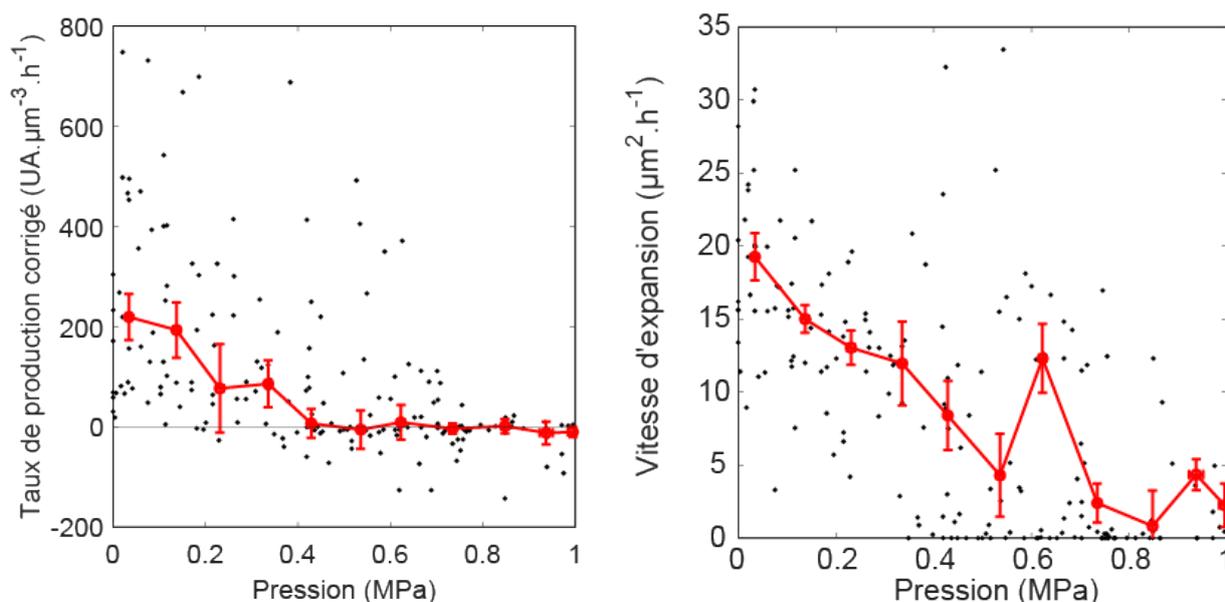


FIGURE 4.8 – (A) Le taux de production net (corrigé de la dilution) diminue avec la pression induite par la prolifération sous confinement spatial. (B) La vitesse d'expansion des cellules apicales diminue avec la pression moyenne dans la chambre microfluidique. (N = 44, 2 réplicas biologiques)

Nous remarquons que les valeurs de taux de production sont plus dispersées entre 0 et 250 kPa et ne diminuent significativement qu'à partir de 300 kPa. Nous avons fait la même observation pour le taux création de protéines durant d'initiation chez les cellules-mères. Lorsque la pression dépasse les 300 kPa, la production protéique nette chute rapidement et nous observons des valeurs négatives indiquant que la dégradation de protéines GFP domine la production sous forte pression.

Dans l'hypothèse où le taux de dégradation (recyclage de protéines) est constant sous pression, ce résultat suggère que le promoteur de *HWPI* devient inactif. Il n'est cependant pas possible de trancher l'origine de ce phénomène avec cette construction. Une première hypothèse d'origine biologique est que le ralentissement de la croissance et l'allongement du cycle entraînent l'inactivation de gènes associées à la croissance hyphale. La signalisation pourrait être aussi directement liée à des voies mécanosensibles comme celles citées chez *S. pombe* et *S. cerevisiae* dans la partie 1.4.

Enfin, il ne peut être exclu l'impact d'une accumulation importante de facteurs chimiques, dont la molécule de *quorum-sensing* farnésol. Nous avons en effet observé un impact *a priori* significatif sur la dynamique de production dans du milieu à 37°C supplémenté en sérum et en farnésol. Cependant, l'impact du farnésol sur la morphogénèse et la croissance hyphale dépend à la fois de la quantité de farnésol et de la composition du milieu (concentration en sérum).

## 4.4 Comparaison des dynamiques de production de Hwp1 entre la phase d'initiation et de maintenance

### 4.4.1 Les taux de production nets nominaux restent comparables entre initiation et maintenance

Nous allons maintenant comparer les taux de production nets de protéines durant l'initiation (cellules-mères d'hyphes) et la maintenance (cellules apicales). Pour cela nous corrigeons le taux de création effectif de protéines des cellules-mères ( $k_{p\text{-eff}}$ ) par les taux de dégradation d'ARN messagers et de protéines selon l'expression suivante :

$$k_{p\text{-net}} = \frac{k_{p\text{-eff}}}{k_{dm}} - (k_{dp} - k_{\text{croissance}}) \times p_0$$

Où  $k_{dm}$  est le taux de dégradation des ARN messagers ( $h^{-1}$ ),  $k_{dp}$  est le taux de dégradation des protéines ( $h^{-1}$ , comportant la dilution dans ce cas).  $k_{p\text{-eff}}$  est le taux de création effectif de protéines ( $UA \cdot \mu m^{-3} \cdot h^{-2}$ ) et  $p_0$  est la concentration de protéines accumulées dans la cellule lorsque le promoteur de *HWPI* devient inactif ( $UA \cdot \mu m^{-3}$ ). Lorsque nous recalculons ainsi le taux de production net pour les cellules-mères à faible pression ( $\leq 15$  kPa), nous obtenons des valeurs similaires à celles des cellules apicales ( $94 \pm 26 UA \cdot \mu m^{-3} \cdot h^{-1}$ ). Nous constatons en revanche que ce taux ne varie toujours pas significativement avec la pression (Fig. 4.9-A).

### 4.4.2 La force d'activation du promoteur semble régulée durant l'initiation

Lorsque nous traçons le taux de production net par cellule en fonction du taux de croissance **moyen** par chambre, nous trouvons que la production nette protéique n'augmente pas significativement (Fig. 4.9-B). Cette tendance contraste avec le cas des cellules apicales d'hyphes (Fig. 4.7-B). Cela peut être expliqué par le fait que le taux de croissance utilisé en abscisse est une moyenne issue de l'ensemble des cellules et non **par** cellule unique. Nous reviendrons sur ce point dans la conclusion de ce chapitre. Une hypothèse est que le promoteur de *HWPI* est régulé par la force du stimulus d'induction appliqué aux cellules, et ne se comporte pas comme un gène essentiel à la croissance durant l'initiation chez les cellules-mères. Nous allons discuter cela dans la partie suivante.

## 4.5 Comparaison à la dynamique d'expression d'un gène constitutif

### 4.5.1 Principe et objectif de l'étude d'un autre promoteur

Alric *et al.* ont observé chez *S. cerevisiae* que des gènes exprimés sur des promoteurs comme *ADH2* et *HIS3* sont exprimés de plus en plus lentement à mesure que la pression de croissance augmente dans la population de cellules confinées spatialement [7]. Afin de vérifier si les observations que nous avons faites sont spécifiques au promoteur de *HWPI*, nous avons caractérisé la variation de la concentration de protéines fluorescentes exprimées par la construction  $P_{ENO1} - EGFP$  en

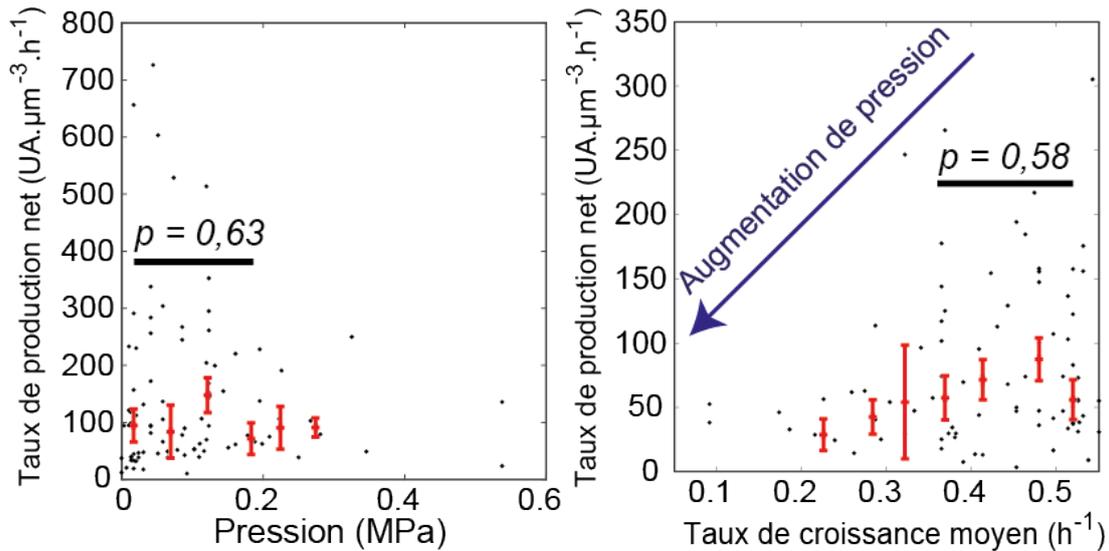


FIGURE 4.9 – (A) Le taux de production net de protéine fluorescence GFP est constant durant l'initiation hyphale sous pression induite par la prolifération sous confinement spatial. (B) Le taux de production net de protéines dans les cellules-mères a tendance à augmenter avec la croissance **moyenne** dans la chambre. Cependant, les valeurs sont dispersées et le taux de croissance des cellules-unicues étudiées n'est pas forcément égal au taux de croissance moyen de la population (bruit biologique intrinsèque).

fonction de la pression moyenne dans la chambre. Le promoteur du gène *ENO1* est actif dans les conditions physico-chimiques étudiées indépendamment du morphotype.

Nous faisons l'hypothèse que le taux de production net (taux de création moins dégradation) de protéines issues de ce gène constitutif est proportionnel à l'intensité de fluorescence. Dans cette hypothèse, lorsque les cellules ne sont pas contraintes, le taux de production net est à l'équilibre avec le taux de croissance, de manière à ce que la protéine se trouve en concentration constante dans le cytoplasme au cours du temps. Nous mesurons donc l'intensité de fluorescence puis nous corrigeons cette valeur par le taux de croissance moyen des cellules dans la chambre. Nous calculons donc la quantité suivante à chaque pas de temps (20 minutes) :

$$k_{\text{production}} = \frac{d_t I}{I(t)} + k_{\text{croissance}}(t)$$

Avec le taux de croissance calculé comme suit,

$$k_{\text{croissance}} = \frac{d_t N}{N(t)} + \frac{d_t V_{\text{biomasse}}}{V_{\text{biomasse}}(t)}$$

Où  $V_{\text{biomasse}}$  correspond au volume total de la chambre microfluidique déformée par la croissance de l'ensemble des cellules qu'elle contient, et  $N$  le nombre de cellules visibles au bas de la chambre contre la lamelle de verre donnant une valeur proportionnelle à la densité cellulaire. Nous avons ainsi accès au taux de variation de la concentration protéique au cours du temps. Notons que cette quantification est dans ce cas quasi-instantanée (20 minutes) et que chaque valeur est calculée à pression quasiment constante par intervalle de temps.

## 4.5.2 La dynamique d'expression diffère selon le promoteur étudié

La production nette de protéines issues de l'activation du promoteur  $P_{ENO1}$  diminue avec la pression dans la chambre, et cette diminution est significative à des valeurs de pressions inférieures à 300 kPa (Fig. 4.10, courbe verte). Nous retrouvons ici le résultat observé par Alric *et al.* chez *S. cerevisiae* qui suggère que la pression limite physiquement la production protéique.

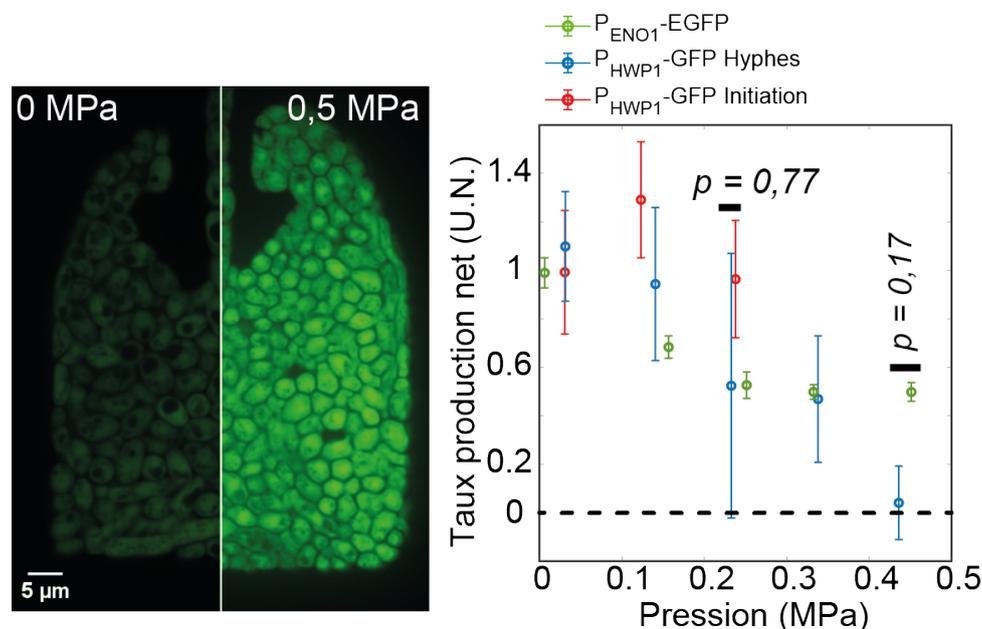


FIGURE 4.10 – (A) Image en fluorescence de la construction  $P_{ENO1}$ -EGFP sous confinement. A gauche sans pression, à droite sous 0,5 MPa. Les protéines sont continuellement produites et s'accumulent dans le cytoplasme des cellules ce qui amène à augmenter l'intensité fluorescence. C'est la dynamique de cette augmentation qui permet d'inférer le taux de production net de protéines. (B) Taux d'expression nets normalisés des souches  $P_{ENO1}$ -EGFP (en vert) et  $P_{HWP1}$ -GFP (en bleu pour les cellules apicales d'hyphes, en rouge pour les levures qui ont initié un hyphe) en fonction de la pression moyenne dans la chambre microfluidique. Notons qu'il n'y a pas de différence significative entre cellules-mères et cellule-apicales à  $\sim 0,2$  MPa ( $p$ -value = 0,77); et entre les deux constructions à 0,45 MPa ( $p$ -value = 0,17).

Le taux de production net (création moins dégradation) des cellules apicales d'hyphes (en bleu) suit une tendance similaire à partir de 200kPa. En revanche, la dynamique de production de la construction  $P_{HWP1}$ -GFP pour les cellules-mères contraste significativement avec celle de  $P_{ENO1}$ -GFP et ne diminue pas avec la pression jusqu'à 300 kPa.

Ce résultat peut signifier que la force d'activation du promoteur de  $HWP1$  chez les cellules-mères vient compenser la limitation biophysique induite par la pression durant l'initiation hyphale. Les données restent trop dispersées pour pouvoir conclure sur la différence entre cellules-mères et cellules-apicales. Si ce résultat est confirmé par l'acquisition de données supplémentaires, il viendrait consolider l'hypothèse que la force d'activation du promoteur de  $HWP1$  est régulée par l'intensité et la nature du stimulus appliqué aux cellules.

Nous avons vu dans l'introduction que les mécanismes moléculaires de l'initiation et de la maintenance sont différents. Il est donc possible que le gène  $HWP1$  se comporte comme un gène essentiel à la croissance dans le cas des cellules apicales d'hyphes, dont l'état épigénétique est sta-

bilisé, ce qui expliquerait la diminution significative au-delà de 200 kPa, la croissance étant alors fortement limitée. Pour les cellules-mères, il serait plus régulé, répondant à un stimulus inductif.

## 4.6 La limitation de croissance sous compression mécanique diffère selon le morphotype

### 4.6.1 La croissance cellulaire diminue avec la pression tandis que l'encombrement intracellulaire augmente

Nous venons de voir que la force d'activation du promoteur de *HWP1* semble être modulée sous pression. Le ralentissement de la production nette protéique des cellules apicales d'hyphes, et de la construction *P<sub>ENO1</sub>-EGFP* sont compatibles avec les observations faites chez *S. cerevisiae* par Alric *et al.* [7] évoquées dans la partie 1.4. Dans cette étude, les auteurs ont aussi montré que la diminution de ce taux avec la pression suit l'augmentation de l'encombrement intracellulaire, et, dans le cas de gènes comme *HIS3* et *ADH2*, les taux de croissance et d'expression protéique net restent corrélés sous contraintes compressives. Est-ce que nous retrouvons ce lien entre limitation de croissance et encombrement chez *Candida albicans*?

Pour cette étude, nous commençons par caractériser la variation de l'encombrement intracellulaire au sein de cellules sous pression induite par la croissance. Pour cela, nous mesurons la diffusion effective à 10 ms dans une construction de *C. albicans* qui encode des nanoparticules de 40 nm de diamètre décorées de protéines fluorescentes<sup>2</sup> appelées GEMs.

Nous inoculons les chambres microfluidiques avec la souche, que nous laissons proliférer dans les mêmes conditions que pour *P<sub>HWP1</sub>-GFP*. Après environ 12 h, nous imageons chaque chambre en champ clair pour déterminer la pression développée. Nous enregistrons également le déplacement des GEMs dans le cytoplasme des cellules par une série d'images en microscopie confocale *spinning-disk* dans le canal de fluorescence, avec un temps d'exposition de 10 ms. La diffusion de ces nanoparticules donne une image de l'encombrement macromoléculaire du cytoplasme des cellules "ressenti" par des objets de taille similaire comme les ribosomes, ou l'ARN messager.

Nous observons que le coefficient de diffusion effectif diminue avec la pression développée sous confinement spatial (Fig. 4.11-A) ce qui signifie que l'encombrement intracellulaire augmente. La variation de la diffusion des GEMs sous pression peut être ajustée par une exponentielle décroissante, avec une pression caractéristique de  $0,92 \pm 0,45$  MPa. Dans le cas de *S. cerevisiae*, ce paramètre est différent et vaut  $\sim 0,6$  MPa.

Cet écart peut être expliqué par le modèle proposé par Alric *et al.* qui prend notamment en compte l'encombrement nominal des cellules pour prédire les taux de croissance et de production de protéines essentielles sous pression. En effet, la pression osmotique interne nominale est de  $\sim 0,95$  MPa chez *S. cerevisiae* (lorsque les levures sont en croissance libre), et la diffusion nominale des GEMs,  $D_0$ , est de  $\sim 0,23 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Soit un écart d'environ 30% sur la pression caractéristique. En augmentant de 30% la valeur de pression osmotique interne, nous sommes alors capables de prédire la courbe d'augmentation de pression induite par la croissance chez *C. albicans* (Fig. 4.11-B).

D'autre part, nous avons évalué l'impact de la pression appliquée sur la croissance de *C. albicans*. Nous obtenons cette information différemment pour le morphotype levure et pour les cel-

---

2. Construction réalisée par nos collaborateurs du groupe de Liam Holt (Université de la ville de New York).

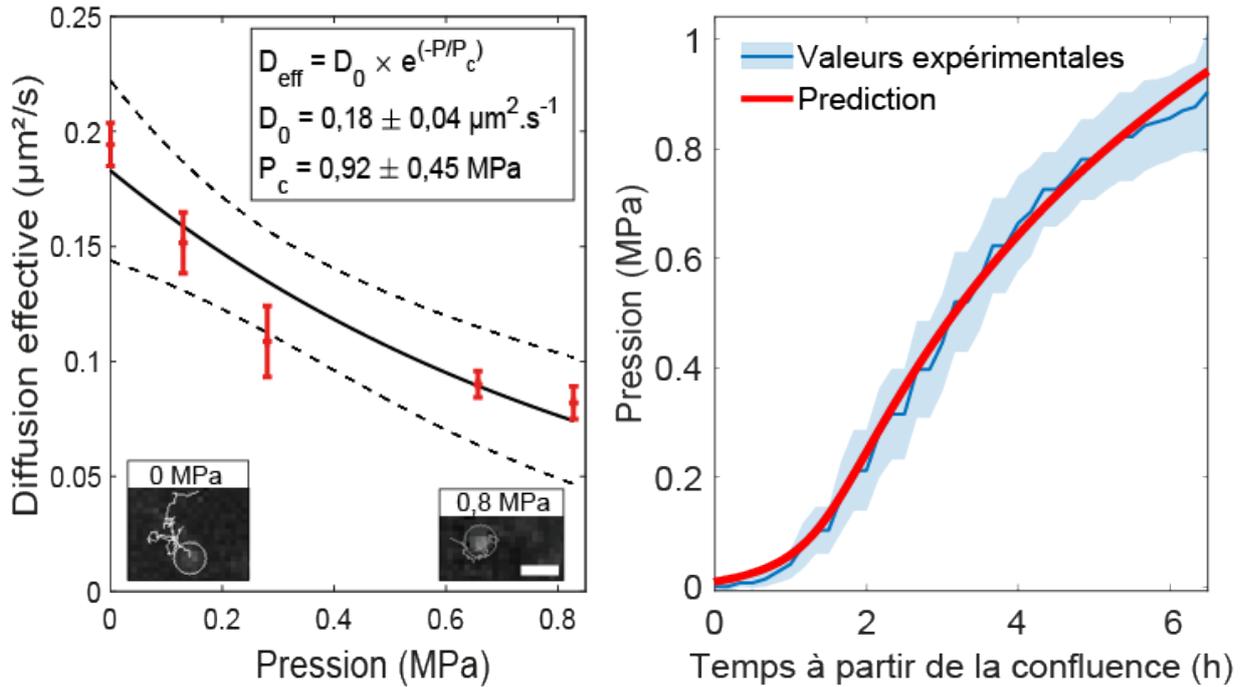


FIGURE 4.11 – (A) La diffusion effective des nanoparticules GEMs diminue avec l'augmentation de pression appliquée. Encarts : illustration des trajectoires caractérisées pour une nanoparticule à pression nulle, et à 0,8 MPa. Noter que la surface explorée (diffusion par mouvement Brownien) est réduite sous pression. (B) Le modèle développé par Alric *et al.* [7] prédit l'augmentation de la pression dans la population confinée chez la levure *C. albicans* en ajustant les paramètres nominaux de croissance, et d'encombrement à pression nulle.

lules apicales d'hyphes.

Dans le cas des levures, nous mesurons un taux de croissance moyen par chambre et non par cellule-unique. Nous faisons l'hypothèse que le taux de division chez les levures correspond au taux de croissance, soit :  $k_{\text{croissance}} = k_{\text{division}}$ . En effet Alric *et al.* ont pu vérifier en faisant des images par tranches optique en Z que le volume *médian* des cellules ne varie pas sous confinement spatial. Par conséquent, l'augmentation de la biomasse (croissance) comprend la contribution du volume total de la chambre, et de la densité de cellules. Nous calculons donc le taux de croissance comme précédemment pour la construction  $P_{ENO1} - GFP$  :

$$k_{\text{croissance}} = \frac{d_t N}{N(t)} + \frac{d_t V_{\text{biomasse}}}{V_{\text{biomasse}}(t)}$$

Nous déterminons la variation du nombre de cellules en les comptant au fil du temps. Pour cette expérience nous n'avons pas à disposition de construction avec seulement le noyau marqué en fluorescence. Nous avons donc utilisé des images en exclusion de fluorescence comme présenté dans le chapitre précédent. Cette mesure introduit donc du bruit car il est parfois difficile de distinguer les cellules avec un bourgeon de celles qui ont achevé la cytokinèse et dont la septation est incomplète. Nous obtenons la variation de la densité de cellules au cours du temps au bas de la chambre microfluidique. Ensuite nous déterminons la contribution de l'augmentation du volume total de la chambre  $V_{\text{biomasse}}$  avec la relation suivante établie par Delarue *et al.* [74] :

$$V_{\text{biomasse}} = V_{\text{vide}} \times (1 + 1,2 \times P)$$

où  $V_{\text{vide}}$  correspond au volume initial de la chambre vide, et  $P$  à la pression développée par la croissance de l'ensemble des cellules. Nous observons que le taux de croissance des levures *C. albicans* diminue avec la pression moyenne dans la chambre (Fig. 4.12-A). Le facteur 1,2 a été déterminé par Delarue *et al.* [74] en estimant la variation du volume total de la chambre de PDMS en fonction de la pression appliquée par des simulations d'éléments finis.

Pour les cellules apicales d'hyphes, nous utilisons les mesures de vitesse d'expansion ( $\partial_t A$ ) figure 4.8. Pour obtenir le taux de croissance, nous divisons chaque valeur par l'aire initiale  $A_0(t)$  correspondant à l'intervalle de temps étudié (Fig. 4.12-B).

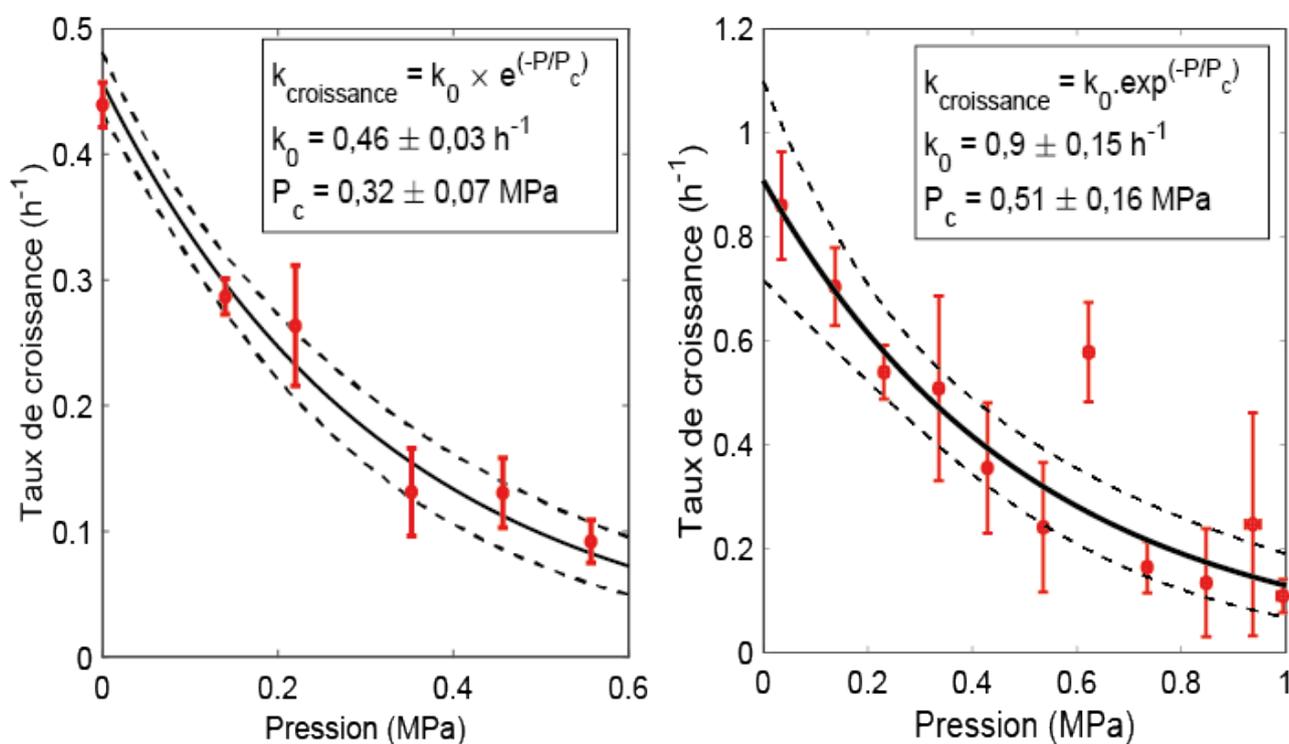


FIGURE 4.12 – Le taux de croissance peut être ajusté par une exponentielle décroissante sous pression, (A) pour les levures, (B) pour les cellules apicales d'hyphes. La pression caractéristique de décroissance ( $P_c$ ) est plus élevée dans le cas des hyphes. Cela suggère que la croissance des hyphes est moins limitée par la pression que celles des levures.

Les taux de croissance des deux morphotypes diminuent avec la pression, et cette diminution peut être ajustée par une exponentielle décroissante. De manière intéressante, la pression caractéristique  $P_c$  avec laquelle ces taux diminuent n'est pas la même selon le morphotype, il est plus élevé de 60% chez les cellules apicales.

Un premier scénario est que le taux de croissance des levures n'est plus égal au taux de division sous pression chez *C. albicans*. En effet une telle observation a été faite chez *E. coli* par une collaboratrice de l'équipe (Laure Le Blanc, Institut Pasteur). Ces bactéries semblent se diviser à volume de plus en plus petit sous pression, suggérant que les taux de croissance et de division cellulaire ne sont plus à l'équilibre. Il serait donc intéressant de vérifier la dispersion en volume des cellules chez *C. albicans* afin de vérifier cette hypothèse d'égalité des taux. Dans la suite, nous allons supposer vraie l'hypothèse d'égalité des taux.

#### 4.6.2 L'écart d'encombrement nominal entre chaque morphotype pourrait expliquer la différence des dynamiques de croissance sous compression

Cet écart de pression caractéristique suggère que la croissance n'est pas limitée de la même façon dans les deux morphotypes. Lorsque nous traçons les taux de croissance normalisés sur une même graphie, nous constatons que les deux morphotypes ne suivent effectivement pas exactement la même tendance (Fi. 4.13-A). Or, le modèle proposé par Alric *et al.* prédit que la variation du taux de croissance avec la pression dépend notamment de l'encombrement nominal de la cellule.

Nous avons donc caractérisé la diffusion effective des GEMs pour chaque morphotype dans le cas de la croissance libre (sans confinement). Afin de ne pas affecter la diffusion par des paramètres expérimentaux différents dans le cas des hyphes, nous avons induit leur croissance à 37°C sous sérum, puis nous avons rincé le milieu et abaissé la température à 30°C. Nous avons attendu au moins 30 minutes avant d'effectuer les mesures. Nous constatons que la diffusion effective nominale est supérieure de ~ 30% chez les cellules-apicales d'hyphes par rapport aux levures (0,26 contre 0,18  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , 4.13-B, encart). En renormalisation la pression par l'encombrement nominal ( $D_0$ ) pour chaque morphotype, les variations des taux de croissance se superposent (Fig. 4.13-B).

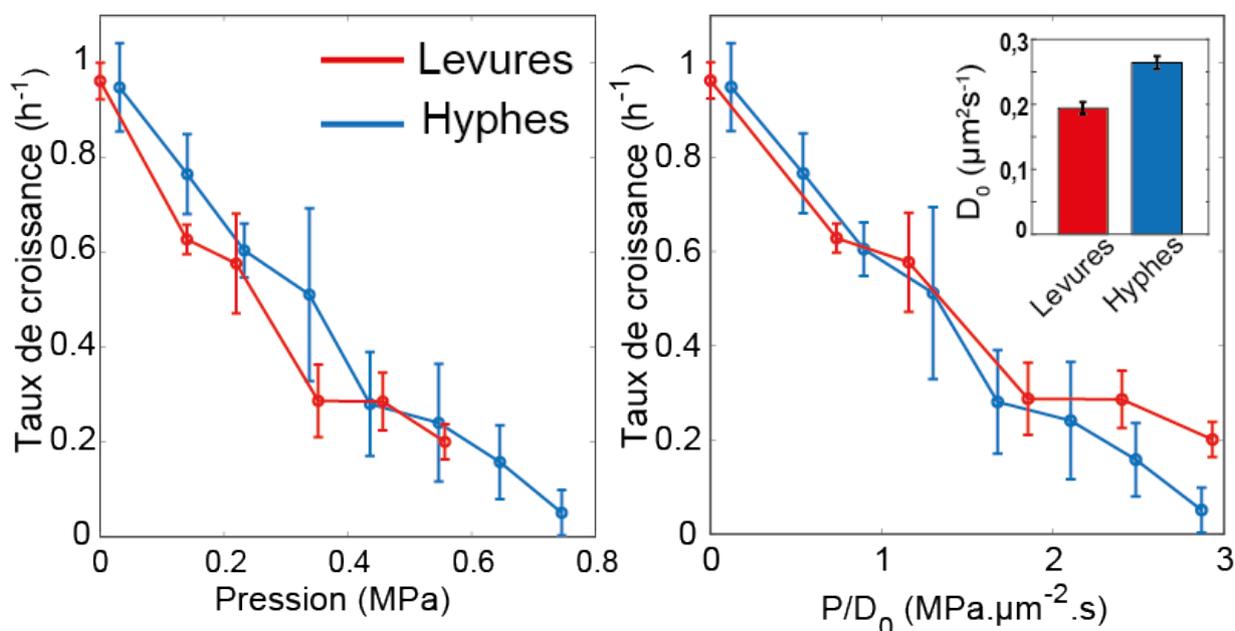


FIGURE 4.13 – (A) Diminution des taux de croissance normalisés avec la pression. En rouge pour le morphotype levure, en bleu pour les cellules-apicales d'hyphes. Noter que la pente est plus importante dans le cas des levures. (B) Normalisation de la pression par l'encombrement nominal de chaque morphotype (indiqué en encart,  $N = 40$  et  $30$  respectivement pour les levures et les hyphes). La dépendance des taux de croissance avec la pression est la même lorsque l'encombrement nominal est pris en compte.

Ce résultat est intéressant car il suggère qu'un même organisme présente des niveaux d'encombrement différents selon l'état morphogénétique dans lequel il se trouve. Cela peut traduire le fait que le niveau d'activité du morphotype hyphal est plus intense. En effet, nous avons vu dans l'introduction que la croissance polarisée est soutenue par un important trafic de vésicules et par le maintien de la plasticité du mur à l'extrémité, via des complexes de polarité. Il est donc possible

que l'état "hyphe" présente un cytoplasme plus fluide par une activité et une circulation interne soutenues et directionnelles.

Ainsi, la croissance pourrait être impactée différemment par la pression appliquée chez un même organisme. L'encombrement nominal pourrait constituer un "avantage" biophysique dans la compétition pour la croissance sous pression, venant se superposer aux autres propriétés biologiques propres à chaque type cellulaire. Cet "avantage" conféré aux cellules apicales d'hyphes pourrait aussi être impliqué dans les mécanismes d'invasion dans des milieux très denses.

## 4.7 Conclusion et perspectives

### 4.7.1 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu que la dynamique d'expression d'un gène hyphal (*HWP1*) est modulée par la pression développée par les cellules *C. albicans* sous pression. La pression induite pas la croissance, couplée à des paramètres physico-chimiques limitants (30°C pH5,5), permet l'initiation hyphale avec une efficacité réduite. Nous avons aussi caractérisé la dynamique de maintenance de la croissance hyphale sur une large gamme de pressions (0 ~ 1 MPa). Le taux de production de *HPWI* diminue sur cette gamme de pression et nous avons observé le même comportement pour un autre gène (*ENO1*) non spécifique au morphotype. Ces données suggèrent que la production protéique est limitée durant la croissance sous forte densité cellulaire.

En revanche, le taux de production de Hwp1 ne varie pas significativement à faible pression (< 200 kPa) dans le cas de l'initiation hyphale et de la maintenance. Ce résultat contraste avec le comportement de *ENO1* et les résultats observés par Alric *et al.* chez *S. cerevisiae* [7]. Cela suggère que la force d'activation du promoteur de *HWP1* compense la limitation biophysique de la pression. Il est donc possible que la pression, selon son intensité, stabilise l'état épigénétique hyphal ce qui en fait un paramètre environnemental important dans la virulence de ce pathogène.

La pression développée par les cellules sous confinement spatial limite leur croissance dans les deux morphotypes, levure et hyphe. En parallèle, l'encombrement intracellulaire moyen augmente sous pression. Ce résultat est compatible avec les observations faites pour *S. cerevisiae* [7], bien que l'augmentation d'encombrement avec la pression est plus lente chez les levures *C. albicans*.

De la même façon, la diminution du taux de croissance sous pression est plus lente chez les hyphes que chez les levures *C. albicans*. Nous proposons que la dynamique de croissance sous pression dépend des paramètres nominaux d'encombrement et de pression osmotique interne. La prédiction du modèle proposé par Alric *et al.* et les courbes de croissance sous pression normalisées par l'encombrement nominal, tendent à confirmer cette hypothèse.

### 4.7.2 Prise en compte de la dilution dans le modèle d'induction de *HWP1*

Tout au long de cette étude, nous avons ajusté des paramètres à partir de mesures sur cellules-unicues. Dans le cas des cellules-mères induisant un hyphes, nous avons inféré du modèle proposé des taux de dégradation d'ARN messagers et de protéines. Or, ces taux de dégradation comportent la dilution due à la croissance des cellules. Nous avons supposé ces taux de dégradation constants sous pression, tandis que le taux de croissance diminue lui avec la pression.

De plus, nous avons observé que plusieurs cellules-mères semblent s'arrêter dans le cycle sous pression et stoppent leur croissance (environ 30% des cellules mesurées, sur un total de 143). Une

série d'images illustre ce phénomène figure 4.14-A. Nous pouvons voir qu'à partir de 12 h 00, la cellule ne semble plus produire de nouveau bourgeon (flèches bleues) et n'entre plus dans un nouveau cycle. La variation de l'intensité de fluorescence de la cellule reflète ce changement de régime (Fig. 4.14-B). A partir de 12 h 00 l'intensité de fluorescence ne diminue plus et stagne.

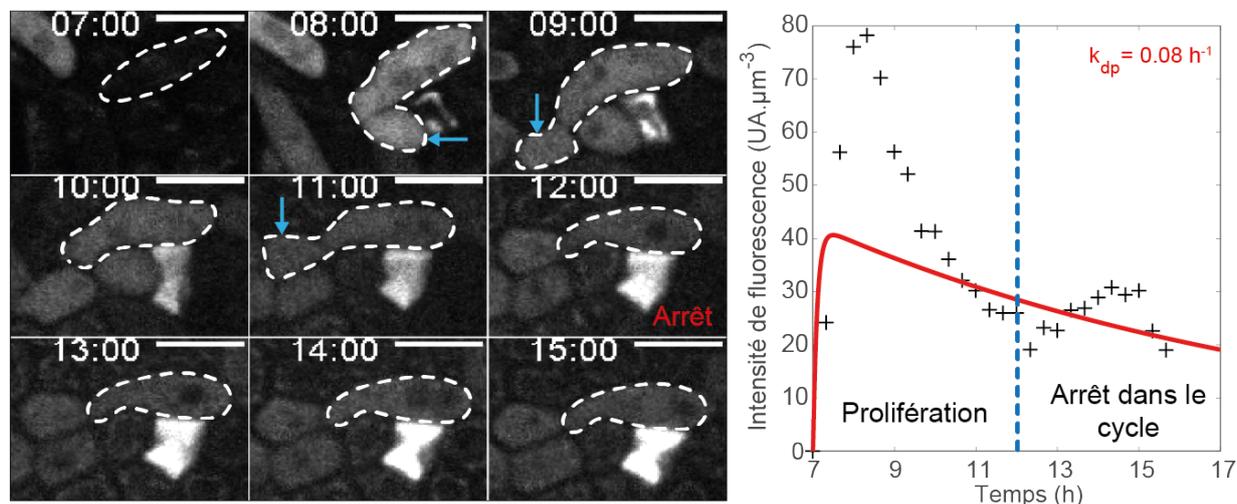


FIGURE 4.14 – (A) Illustration d'une cellule mère qui prolifère et produit des bourgeons (flèches bleues) puis finit par s'arrêter dans le cycle lorsque la pression augmente. A partir de 12h00 et pendant les 3 h qui suivent, nous ne distinguons plus de nouveau bourgeon. Echelle 5  $\mu\text{m}$ . (B) L'intensité de fluorescence semble refléter l'arrêt de croissance de la cellule étudiée. Dans ce cas, le modèle n'ajuste par correctement les paramètres car le taux de dégradation, supposé constant sous pression, comporte la dilution par la croissance. Or la croissance ralentit voire s'arrête de manière stochastique dans la population de cellules étudiées.

Nous supposons qu'avant cet arrêt de croissance, la concentration de protéines (proportionnelle à l'intensité) est affectée à la fois par la dégradation et par la dilution. Après l'arrêt de la croissance, seul le terme de dégradation subsiste, il semble ici très faible puisque l'intensité devient quasi constante. Tel que nous l'avons développé, le modèle ne permet pas encore discriminer les deux phénomènes décrits.

Nous pouvons voir que la courbe ne suit plus les données expérimentales, et que le taux de dégradation de protéines ajusté est très faible. En première approche, nous avons tenté de répondre à cette limitation en incorporant le taux de croissance *moyen* de la population au modèle. Les paramètres de dégradation sont ainsi réécrits dans l'équation  $\mathbf{p}(t)$  sous la forme :

$$\begin{cases} k_{dm} = k_{dm-net} + k_{croissance}(P) \\ k_{dp} = k_{dp-net} + k_{croissance}(P) \end{cases}$$

Nous avons utilisé le taux moyen de croissance dans la chambre défini comme suit en fonction de la pression :

$$k_{croissance} = k_0 \times e^{\frac{-P}{P_c}}$$

où  $k_0$  est le taux de division en croissance libre (estimé ici à  $0,55 \text{ h}^{-1}$ ) et  $P_c$  la pression caractéristique limitant la croissance, déterminée d'après l'ajustement d'une exponentielle décroissante sur les données expérimentales ( $0,32 \pm 0,07 \text{ MPa}$ ).

Cette première approche n'a pas apporté d'amélioration significative (pas de réduction de la somme des écarts résiduels entre le modèle et les données). Nous proposons que l'impact de la pression sur chaque cellule dépend de son état biologique propre, et que les arrêts dans le cycle observés sont des phénomènes stochastiques. Il n'est donc finalement pas adapté d'incorporer directement des paramètres moyens dans un modèle ajustant des paramètres de cellules-uniques, du moins sans prendre en compte le bruit biologique.

Par la suite, il serait donc intéressant de raffiner l'étude en notant les phénomènes d'arrêt dans le cycle ou d'incorporer le bruit biologique au modèle. Pour cela, une construction avec des noyaux marqués en fluorescence faciliterait particulièrement l'étude.

### 4.7.3 Maintien de la croissance hyphale si la pression est relaxée

Nous avons vu dans ce chapitre que la croissance hyphale ralentit sous pression et que ce ralentissement s'accompagne d'une baisse de la production nette du gène associé aux hyphes *HWP1*. De plus, la production nette devient quasiment nulle lorsque la vitesse d'expansion est inférieure à environ  $5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$  suggérant un effet de seuil. Ce résultat contraste avec la dynamique de production nette obtenue par addition de sérum à  $37^\circ\text{C}$  qui semble proportionnelle à la croissance.

La figure 4.15 illustre ce qui apparaît comme une réversion de la forme hyphe vers la forme levure dans une population très dense. Sous forte pression ( $> 400 \text{ kPa}$ ) nous observons que la cellule apicale de l'hyphe forme un bourgeon ayant l'aspect d'une levure. Est-ce que la limitation de la croissance (ou l'accumulation de farnésol) suffit à expliquer ce phénomène de réversion? Est-ce que la compression mécanique peut permettre une croissance hyphale stable si elle est ensuite relaxée?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons conçu un nouveau dispositif microfluidique, comportant un second compartiment. Ce compartiment de  $100 \mu\text{m}$  de long pour  $50 \mu\text{m}$  de large est relié à la chambre de confinement des levures via des canaux de  $0,8 \mu\text{m}$  de haut pour  $1 \mu\text{m}$  de large. Ces dimensions permettent de laisser traverser les éventuels hyphes dont le diamètre moyen est de  $2 \mu\text{m}$ , tout en retenant les levures, dont le diamètre moyen est de  $5 \mu\text{m}$  (Fig. 4.15).

Nous avons ainsi pu observer sur plusieurs heures la croissance d'hyphes pénétrant dans le second compartiment, tandis que la pression continue d'augmenter dans la chambre de confinement spatial. La croissance hyphale est stable sur plusieurs cycles cellulaires (7 h) dans des conditions physico-chimiques pourtant favorables à la forme levure (pH acide,  $30^\circ\text{C}$  et 2% glucose). Ce résultat montre que la mécanique permet d'induire un changement épigénétique robuste vers le morphotype hyphal.

La cellule apicale de l'hyphe semble donc maintenir la croissance polarisée sous relaxation mécanique. En parallèle, nous avons aussi remarqué que les cellules subapicales produisent des branchements (flèches bleues Fig. 4.16). Chaque branchement latéral produit lui-même des levures, formant une chaîne de cellules de moins en moins polarisées au fil des générations (Fig. 4.17-B). Ce comportement contraste avec l'induction sous sérum à  $37^\circ\text{C}$ . Dans ce cas nous avons observé que les branchements produisent au contraire des cellules de **plus en plus** polarisées et reviennent *in fine* à la morphologie hyphale. Ce phénomène semble ainsi dépendre de la présence de stimuli extracellulaires.

Il serait donc intéressant de caractériser la dynamique de réversion de ces branchements dans différentes conditions. S'agit-t-il d'un mécanisme régulé comme le suggère Shen *et al.* dans leur étude du gène *PES1* [260]? Ou bien, est-ce que les facteurs de polarisation sont simplement dilués au fil des cytocinèses entraînant une réversion morphologique progressive dans le cas de la figure

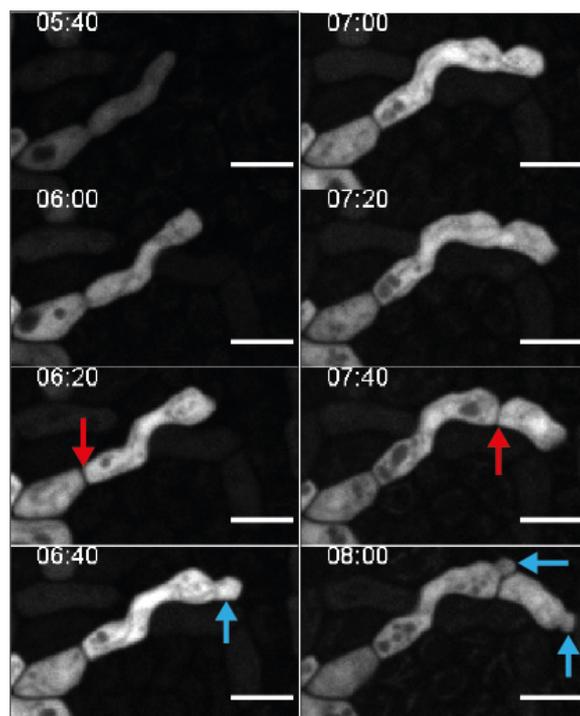


FIGURE 4.15 – Image en microscopie confocale illustrant la croissance d'un hyphe dans une population dense et confinée. Les flèches rouges marquent les septations et les flèches bleues l'apparition de bourgeons. La cellule apicale après septation à 7 h 40 est deux fois moins allongée suggérant la réversion vers la forme levure. Échelle 5  $\mu\text{m}$

4.16?

L'étude de la formation des levures latérales nous paraît particulièrement intéressante car elles pourraient participer aux mécanismes de virulence reliés à la mécanique. En effet, nous avons observé (Fig. 4.17) la formation de larges amas de levures latérales le long d'hyphes envahissant un milieu semi-solide (agar). Il n'est pas exclu que ces amas développent des forces mécaniques, reproduisant qualitativement le phénomène observé sous confinement spatial dans nos dispositifs microfluidiques.

Nous avons réalisé une première version de ce dispositif avec des compartiments de 10  $\mu\text{m}$  de hauteur. Nous avons prévu une nouvelle version avec des compartiments plus longs (200  $\mu\text{m}$ ) et moins épais (2  $\mu\text{m}$  de hauteur). De cette façon nous pourrions observer la dynamique d'expression de gènes associés aux hyphes dans des constructions génétiques comme  $P_{HWP1} - GFP$ , durant la maintenance (ou la réversion) après relaxation mécanique.

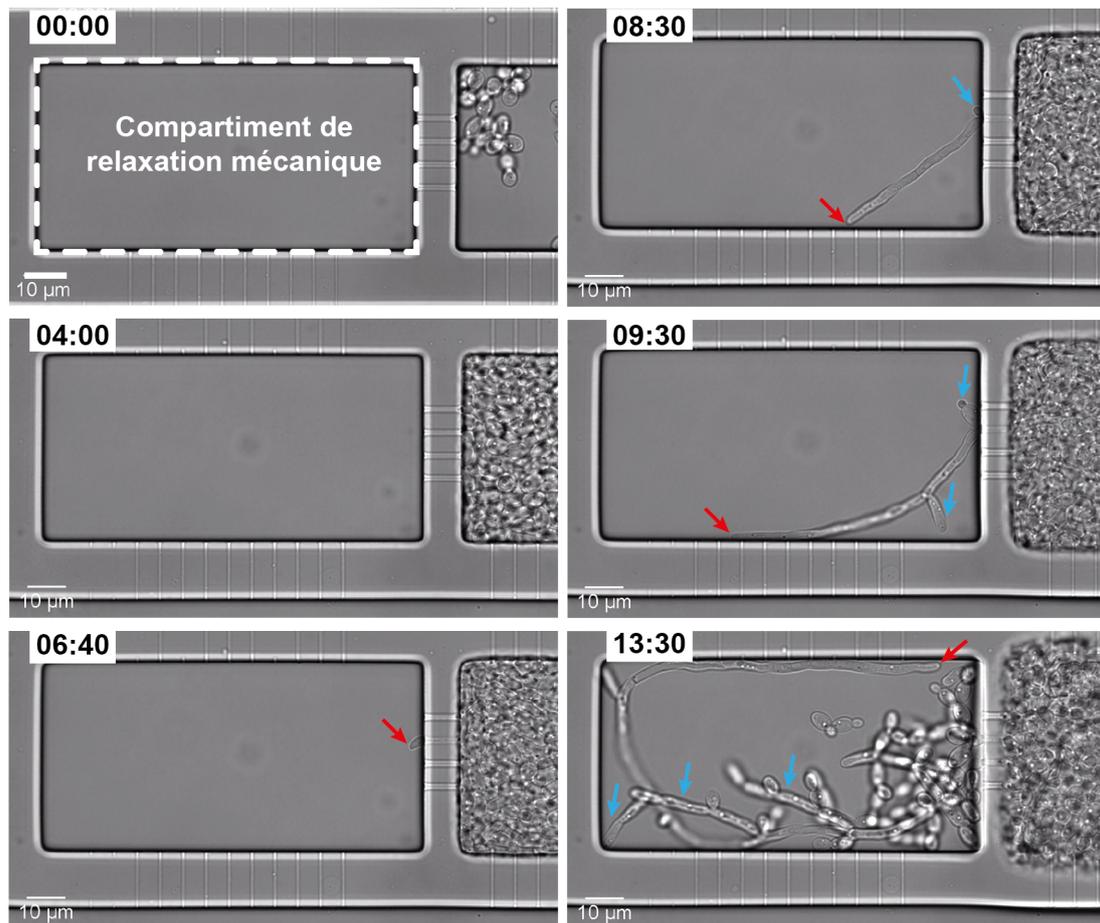


FIGURE 4.16 – Images en champ clair d'un second type de dispositif microfluidique permettant de relaxer la contrainte mécanique sur les hyphes. La pression induite par la prolifération augmente dans la chambre de droite à partir de 4 h. Un hyphe croît hors de cette chambre à partir de 6 h 40 (flèche rouge). L'hyphe maintient la croissance polarisée à l'extrémité pendant plusieurs cycles cellulaires (au moins 7 h). Les cellules subapicales en amont produisent des branchements qui révertent sous forme levure (flèches bleues). Échelle 10 µm.

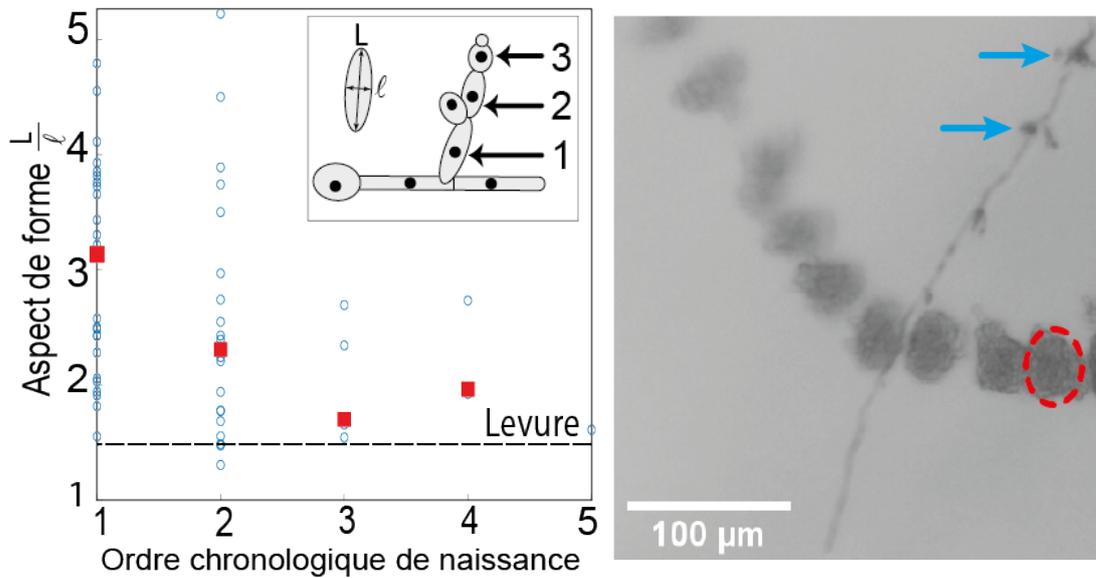


FIGURE 4.17 – (A) Aspect de forme des cellules apicales issues de branchements d'hyphes, par ordre de naissance comme indiqué en encart. Les cellules latérales sont de moins en moins polarisées suggérant une réversion de la polarisation. L'aspect de forme basal mesuré pour une cinquantaine de levures planctoniques est indiqué par la ligne en pointillés (1,2). (B) Image en champ clair de la croissance d'hyphes envahissant une gélose de milieu nutritif à 2% d'agar après 15 jours de culture à température ambiante. Notons la production de levures latérales par les cellules sub-apicales d'hyphes (flèches bleues). Ces cellules latérales semblent former des structures denses (cercle rouge) réparties le long de l'ensemble de l'hyphe. Échelle 100 μm.



## Chapitre 5

# Modulation de la morphogénèse par couplage mécano-chimique : le cas du pH

Dans les chapitres précédents nous avons vu que la pression de croissance favorise l'induction d'hyphes dans une population confinée. La probabilité d'induction sous pression est aussi modulée par la sécrétion de molécules de *quorum-sensing*, comme le farnésol. Durant l'initiation, la force d'activation d'un promoteur de gène hyphal, *HWPI*, ne semble pas diminuer pas avec la pression, contrairement au cas d'un autre promoteur indépendant du morphotype, (*ENO1*), et au cas de maintenance de la croissance des hyphes.

Ces observations ont été faites dans un contexte physico-chimique particulier de pH et de température. Notre système microfluidique permet de simplifier le jeu de paramètres appliqués. Nous avons cependant observé un comportement complexe qui suggère un couplage spatio-temporel entre mécanique et transport en milieu poreux. Nous nous sommes alors interrogé sur le **couplage entre mécanique et d'autres paramètres de l'environnement**. Nous avons en effet vu en introduction que le réseau de signalisation modulant la morphogénèse implique de nombreuses cascades moléculaires, pouvant interagir entre elles.

Parmi la multitude de paramètres possibles, **nous nous sommes intéressés au pH**. Ce paramètre a l'avantage d'être modulable (gamme de milieux pH-ajustés), sans pour autant modifier *a priori* la dynamique de prolifération des cellules comme le ferait un changement de température ou de composition du milieu (déprivation de glucose ou ajout de sérum par exemple). L'ensemble des expériences et résultats de l'étude préliminaire présentée dans ce chapitre ont été réalisés durant le stage de Nadir El-Fassi dans le cadre de son Master 2. Son objectif initial était de **comparer l'efficacité de transition levure-hyphe sous pression de croissance à pH5,5 (considéré comme un point de contrôle) et à pH 7 (favorable à l'initiation d'hyphes)**.

Ce chapitre s'articule autour de trois résultats. Tout d'abord, Nadir a étudié la répartition spatio-temporelle des inductions à pH 7 et pH 5,5 sous pression de croissance. De manière surprenante, la quasi-totalité des inductions à pH 7 advient *avant* l'arrivée à confluence. Nadir a exploré des hypothèses pouvant expliquer ce comportement et particulièrement, l'impact du *quorum-sensing* et du renouvellement du milieu en début d'expérience. Ensuite, il a caractérisé l'impact du pH sur l'activité du promoteur de *HWPI* durant l'initiation. Il semble que le taux de production de *Hwp1* augmente sous pression de croissance avec le pH. Finalement, Nadir n'a pas observé de différence significative sur la dynamique de maintenance de croissance hyphale à pH5,5 et pH7. Ce résultat renforce l'hypothèse que la **maintenance** du programme hyphal est plutôt dominée par la pression de croissance dans nos expériences.

## 5.1 Répartition spatio-temporelle des inductions d'hyphes à pH 5,5 et pH 7 sous pression de croissance

### 5.1.1 Les inductions d'hyphes adviennent avant l'arrivée à confluence à pH 7,0

Une première étude a consisté à vérifier l'impact du pH sur la répartition temporelle et spatiale des inductions dans les populations sous confinement. Nadir a donc utilisé les mêmes dispositifs microfluidiques décrits dans les chapitres précédents. Ces puces microfluidiques permettent d'explorer simultanément deux conditions chimiques. Nadir a donc perfusé une entrée avec du milieu de culture ajusté à pH 5,5 et l'autre avec du milieu ajusté à pH 7. De plus, afin de limiter les changements physico-chimiques en début d'expérience, chaque culture cellulaire a été réalisée au même pH que la condition expérimentale testée. La température est toujours ajustée à 30°C.

Nadir a imagé les chambres de confinement en fluorescence et a décompté les occurrences d'inductions manuellement, selon le même protocole décrit Chapitre 3. Un exemple typique d'une chambre perfusée à pH 7 est montré figure 5.1.

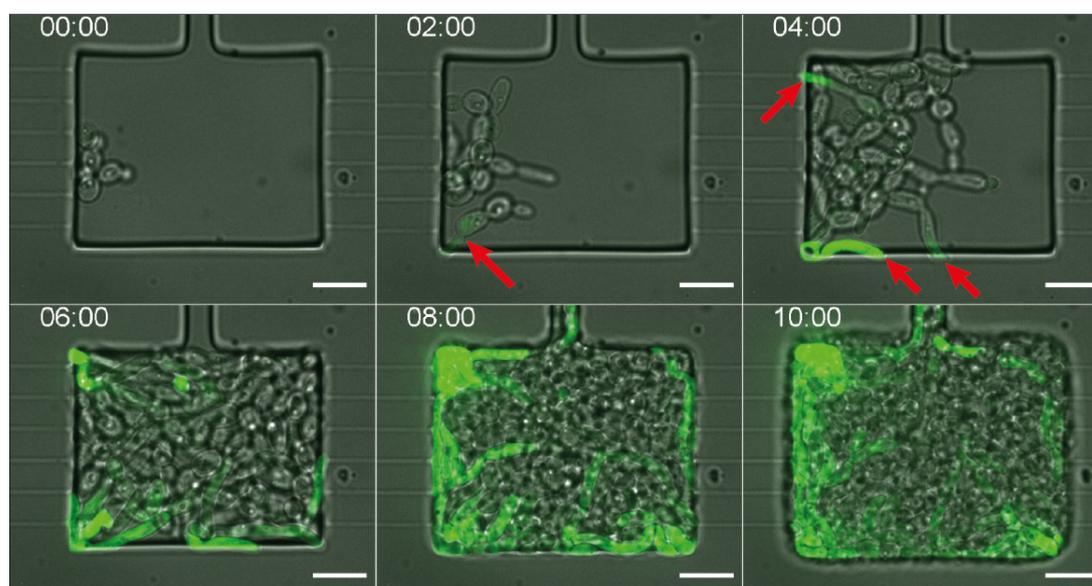


FIGURE 5.1 – Images superposant champ clair et fluorescence d'une chambre typique perfusée à pH7. Noter la présence d'hyphes exprimant le rapporteur fluorescent (sur le gène *HWPI*) dès deux heures suivant l'inoculation (flèches rouges). Parvenue à confluence dans la chambre, la population contient déjà plusieurs hyphes avant que la pression de croissance n'augmente. Echelle : 10  $\mu\text{m}$ .

Tout d'abord, nous observons qu'une plus grande portion de la surface de la chambre est occupée par des hyphes qu'à pH 5,5 après confluence. Cela suggère qu'un pH neutre est effectivement plus permissif qu'un pH acide pour la croissance d'hyphes. Mais l'observation la plus frappante est que nous pouvons voir des hyphes dès les premières heures de l'expérience, bien avant l'arrivée à confluence. Nadir a représenté le décompte des inductions sur un histogramme spatio-temporel à pH 5,5 et pH 7. Comme présenté dans le Chapitre 3, la position des inductions est renormalisée par rapport à la distance aux entrées de renouvellement de milieu, et le temps est recentré à l'arrivée à confluence pour chaque chambre. Nous supposons que le nombre total de cellules au cours du temps est approximativement le même dans chaque chambre. Afin de pouvoir comparer les

conditions à pH 5,5 et pH 7, Nadir a renormalisé le décompte des inductions par le nombre total de chambres observées.

Nous observons qu'à pH 5,5 la majorité des inductions advient dans les heures qui suivent la confluence (Fig. 5.2-A). Ces inductions sont également majoritairement au bord, nous avons expliqué ce phénomène par un gradient de farnésol endogène dans la chambre Chapitre 3. A pH 7, 85% des occurrences d'initiations sont observées avant la confluence pour 4 réplicas biologiques indépendants réalisés (Fig. 5.2-B). La répartition spatiale uniforme à pH7, avant confluence, est compatible avec notre modèle de rinçage de farnésol, qui serait plus efficace à faible densité de population. En revanche, nous ne retrouvons pas le gradient spatial d'induction passé la confluence. Nous manquons encore de recul vis-à-vis des hypothèses du modèle proposé à pH 7, nous y reviendrons par la suite.

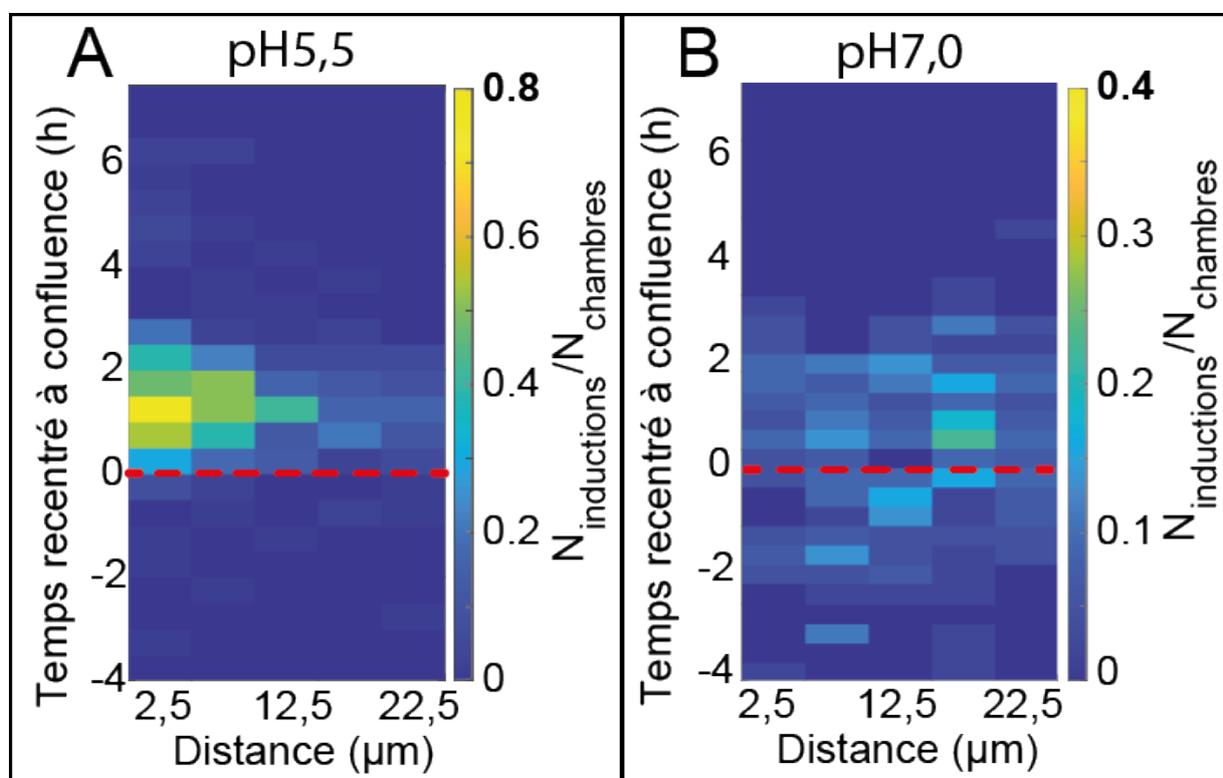


FIGURE 5.2 – Répartition spatio-temporelle des inductions en fonction du pH sous pression de croissance et perfusion de milieu de culture. (A) à pH 5,5 et (B) à pH 7,0. Noter l'échelle de couleurs (maximum à 0,8 pour pH5,5 et 0,4 pour pH 7).

Il semble donc qu'il y ait un ou plusieurs stimuli en tout début d'expérience, qui favorisent la transition levure vers hyphe dans notre système. Nous avons émis plusieurs hypothèses pouvant expliquer pourquoi la majorité des inductions hyphales arrive dès le début de l'expérience après l'inoculation de nos puces à pH 7. Dans la partie suivante nous discuterons l'hypothèse principale, reposant sur le rinçage du farnésol à pH permissif pouvant stochastiquement amener à une transition levure vers hyphe.

### 5.1.2 Impact du renouvellement du milieu de culture sur la probabilité d'induction d'hyphes

Notre principale hypothèse est que **les cellules ont une probabilité non-nulle d'induire lorsque tout le farnésol est rincé à pH neutre**, plus permissif à l'induction. Pour évaluer l'importance du renouvellement de milieu sur la probabilité d'initiation avant confluence, Nadir a utilisé le surnageant de la culture cellulaire sur la nuit, à pH 7, pour perfuser la puce à pH 7. Nous souhaitons ainsi éviter tout changement brutal dans la composition du milieu en début d'expérience. Pour cela, il a prélevé et filtré la moitié d'une suspension cellulaire (ajustée à pH7) à faible densité de cellules (densité optique inférieure à 0,2). Il a ensuite inoculé l'autre moitié dans la suspension contenant les cellules dans la puce.

Nous avons vérifié que les courbes d'augmentation de pression induite par la croissance après confluence ne présentaient pas des dynamiques différentes entre chaque condition (Fig. 5.3). Nous n'avons pas observé de différence significative dans les premières heures suivant la confluence, suggérant que la potentielle déplétion de nutriments (glucose, acides aminés) dans le surnageant était mineure et ne limitait pas significativement la prolifération dans cette fenêtre temporelle.

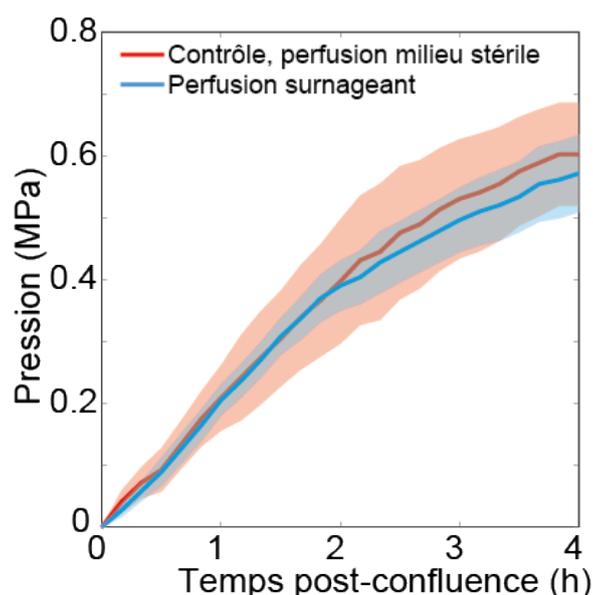


FIGURE 5.3 – Pression induite par la croissance de cellules à pH 7, avec une perfusion de milieu surnageant (bleu) et une perfusion avec du milieu stérile (rouge).

Nadir a observé qu'en utilisant du surnageant issu d'une culture cellulaire, les initiations d'hyphes sont retardées par rapport au contrôle et adviennent **majoritairement à confluence** (Fig. 5.4). Ce résultat d'expérience suggère qu'un couplage entre renouvellement du milieu et pH neutre augmente la probabilité d'induction avant le développement de la pression de croissance. **Nous proposons que le farnésol présent dans le surnageant inhibe ces inductions liées au seul rinçage sans pression de croissance.** Cette probabilité sous rinçage serait aussi liée au pH, car un pH acide étant moins favorable à l'induction d'hyphes, nous attendons moins d'inductions à pH 5,5 qu'à pH 7 avant confluence, ce que suggèrent nos expériences. De plus, la concentration inhibitrice de farnésol serait plus faible que celle nécessaire à inhiber la transition sous pression ou sérum, car sinon nous n'observerions pas de transition à confluence.

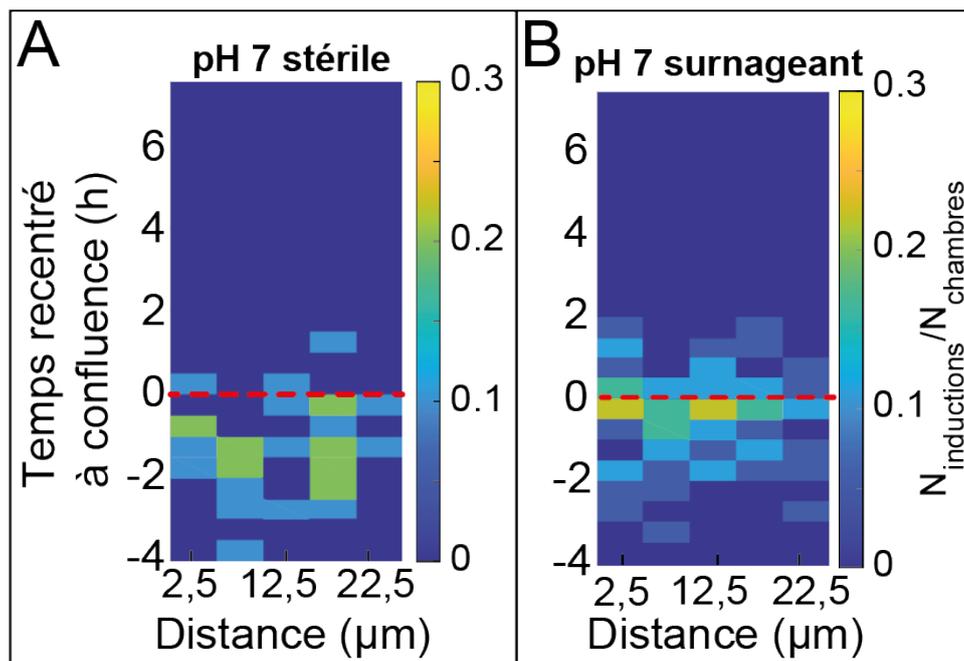


FIGURE 5.4 – Répartition spatio-temporelle des inductions à pH7 en fonction du renouvellement du milieu perfusé. (A) milieu perfusé stérile (B) perfusion du surnageant filtré à partir de la culture cellulaire inoculée.

### 5.1.3 Impact d'un changement de pH sur la probabilité d'induction d'hypes

Nadir a ensuite interrogé l'impact de la variation du pH en début d'expérience sur la répartition des inductions dans nos dispositifs. **Est-ce que l'augmentation soudaine du pH constitue un stimulus supplémentaire favorisant l'induction avant confluence sous advection/rinçage de milieu ?**

Deux conditions ont été testées. D'une part, une culture cellulaire à pH 5,5 perfusée dans la puce avec du milieu à pH 7, et d'autre part, une culture à pH7 perfusée à pH5,5 (Fig. 5.5).

Nadir a également résumé l'ensemble de ses observations figure 5.6, où nous pouvons voir la part des inductions avant et après confluence pour toutes les conditions de pH étudiées.

Nous remarquons alors que lorsque le pH est brusquement augmenté en début d'expérience (pH 5,5 vers pH 7) environ 85% des inductions arrivent avant confluence. Nous n'observons pas de répartition significativement différente par rapport à la condition "culture et perfusion à pH 7" présentée dans le paragraphe précédent. Cela suggère que l'augmentation brusque du pH ne constitue pas un stimulus supplémentaire augmentant l'efficacité d'induction avant confluence. Il semble donc que ce serait **la valeur de pH elle-même qui module l'induction sous advection** uniquement, plutôt que sa variation.

Dans le cas d'une diminution du pH en début d'expérience (pH7 vers pH5,5), il semble qu'il y ait autant d'inductions avant, qu'après la confluence. Ce comportement ne correspond ni au pH5,5 ni au pH7. Une possibilité pourrait être que les cellules adaptent leur métabolisme au pH environnant et conservent une mémoire (épigénétique et/ou cytoplasmique) de cet état.

Ces résultats suggèrent qu'il existe une probabilité stochastique de transition levure-hyphe, non-nulle, sous rinçage de farnésol, qui dépendrait du pH. L'origine de cette stochasticité est inconnue, tout comme ce résultat jamais décrit à notre connaissance dans la littérature. Cela dit, cette probabilité stochastique de transition d'état a été observée dans le cas du changement de

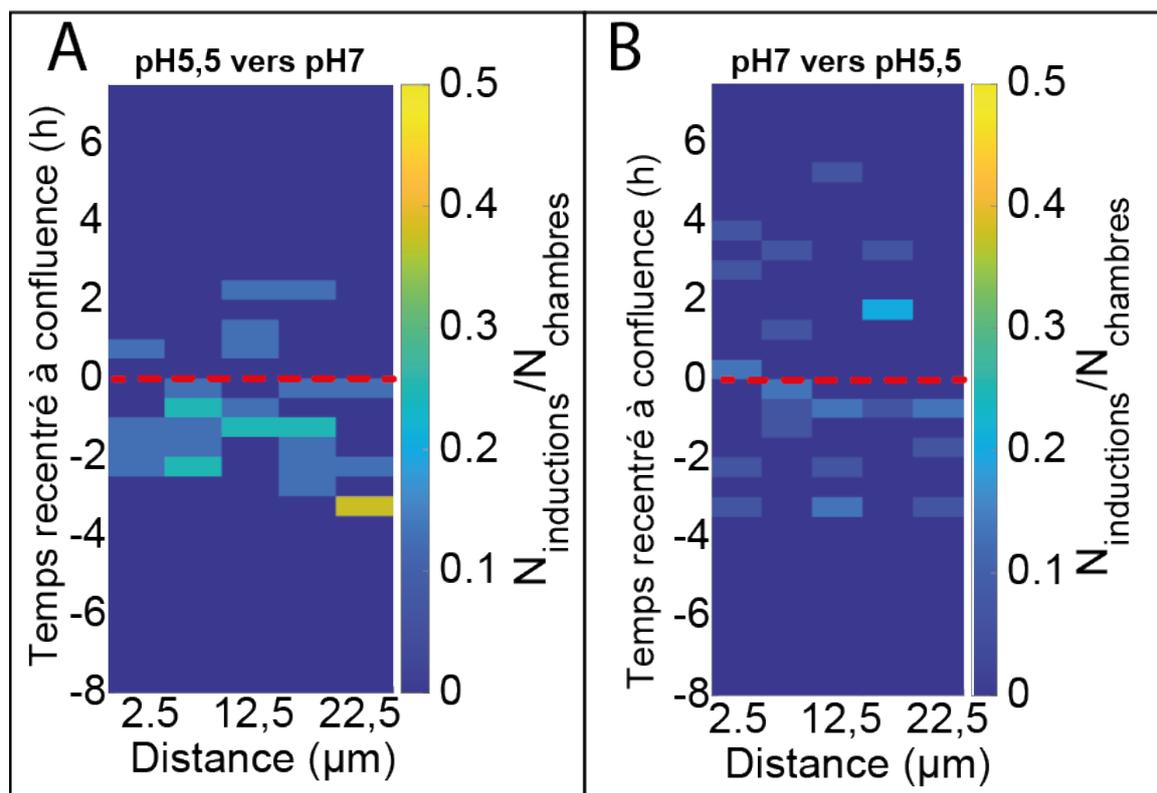


FIGURE 5.5 – Répartition spatio-temporelle des inductions en fonction du changement de pH à l'inoculation de la puce. (A) Culture à pH 5,5 et perfusion à pH 7, (B) culture à pH 7 et perfusion à pH 5,5.

morphotype "*blanc-opaque*" évoqué dans la partie 1.1.2, notamment par Ziv *et al.* [321].

## 5.2 Modulation du pH sur la dynamique d'initiation et de maintenance hyphale en *cellule-unique*

### 5.2.1 Modulation de la dynamique d'expression de *HWPI* par le pH durant l'initiation

Après avoir interrogé la modulation de la probabilité d'induction à l'échelle de la population, Nadir a réalisé une étude de la dynamique d'expression du rapporteur sur *cellule-unique* dans les chambres. Il a utilisé le modèle développé précédemment, présenté dans le Chapitre 2 (partie 2.3.2). Dans cette première étude du pH, nous nous sommes intéressés à la durée de transcription, et au taux de production de GFP issue de la construction  $P_{HWPI}-GFP$ . Nadir a mesuré l'intensité de fluorescence pour des cellules-mères d'hyphes sous pression de croissance à pH 5,5 et pH 7. Il a ensuite regroupé les paramètres ajustés du modèle et a calculé leur valeur moyenne pour comparer les deux conditions de pH.

La durée de transcription semble diminuer avec le pH sous pression de croissance (Fig. 5.7-A). Cette observation est compatible avec les hypothèses proposant que la concentration de farnésol module la durée d'expression de *HWPI* durant l'initiation, et que le taux de sécrétion de farnésol dépend peut-être du pH.

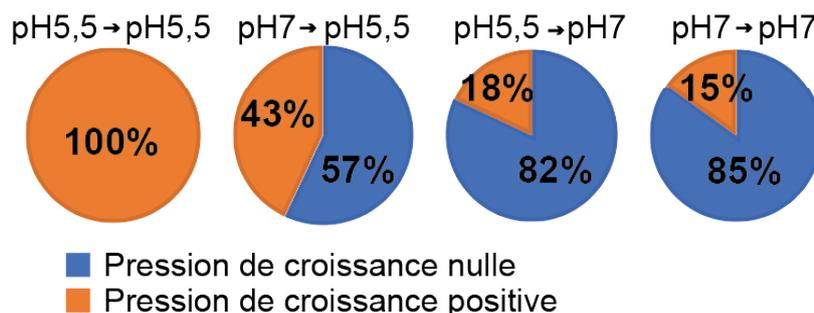


FIGURE 5.6 – Pourcentage d’inductions avant confluence, à pression nulle, et après confluence, à pression de croissance positive, en fonction du changement de pH entre la culture cellulaire et la perfusion durant l’expérience.

*A contrario*, le taux de production de GFP augmente avec le pH (Fig. 5.7-B). Ce résultat est compatible avec l’hypothèse émise dans le chapitre précédent qui suggère que la force d’activation de ce promoteur spécifique aux hyphes est régulé. L’activité du promoteur dépend des stimuli appliqués et compense la limitation biophysique de la pression.

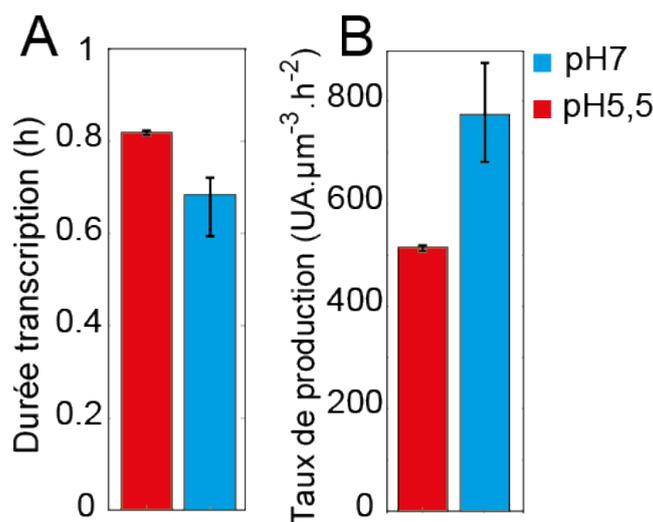


FIGURE 5.7 – (A) Durée moyenne de la fenêtre de transcription à pH5,5 et pH 7 et sous pression de croissance. (B) Taux de production moyen du rapporteur de croissance hyphale à pH5,5 et 7 sous pression de croissance.

### 5.2.2 La pression module la dynamique d’expression de *HWP1* durant l’initiation à pH7

Nous nous sommes également demandé si la pression induite par la croissance module la durée de transcription et la force d’induction de manière similaire à pH 5,5 et pH7. Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la durée de transcription diminue significativement avec la pression de croissance tandis que le taux d’expression a tendance à augmenter.

En première approche pour cette étude, Nadir a calculé ces deux paramètres pour trois catégories de mesures à pH 7. Le premier groupe concerne toutes les occurrences qu’il a pu détecter au moins une heure avant l’arrivée à confluence et le développement de la pression de croissance. Le

second regroupe les mesures faites entre 1 heure avant l'arrivée à confluence, et une heure après. Finalement, le troisième regroupe les mesures faites au moins 1 h après la confluence, lorsque la pression de croissance est supérieure à 250 kPa environ. Par la suite, si nous accumulons suffisamment de données, il serait intéressant de comparer les mesures directement en fonction de la pression, comme pour le contrôle à pH5,5.

Nous remarquons qu'à pH neutre, la durée de transcription semble diminuer avec la pression de croissance, passé la confluence (Fig. 5.8-A). En parallèle, le taux de production de protéines augmente avec la pression.

Ces deux résultats sont similaires à ceux observés dans le cas du pH5,5. Ils sont compatibles avec les deux hypothèses que nous avons déjà émises. D'une part, la réduction de la fenêtre de transcription durant l'initiation pourrait être reliée à l'augmentation de la concentration locale de farnésol dans la population de plus en plus dense. D'autre part, la force d'activation du promoteur durant l'initiation pourrait être régulée par la pression, et cette régulation biologique viendrait contrebalancer la limitation biophysique de la prolifération par cette même pression. Il semblerait de plus que le pH se couple à la pression pour augmenter encore plus l'expression des gènes régulant la transition levure vers hyphe.

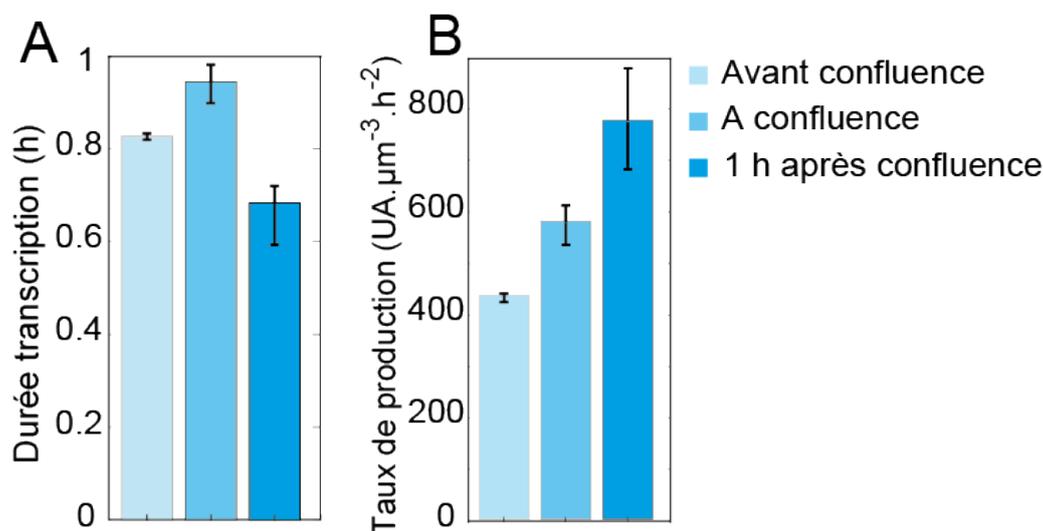


FIGURE 5.8 – (A) Modulation de la fenêtre de transcription à pH 7 avant confluence, et sous pression de croissance. (B) Modulation du taux de production du rapporteur de croissance hyphale, avant confluence et sous pression de croissance. "Avant confluence" : toutes les inductions qui ont débuté au moins 1 h avant l'instant de confluence. "A confluence" : toutes les occurrences entre - 1 h et + 1 h de la confluence. "Après confluence" : toutes les occurrences apparues au moins 1 h après confluence.

### 5.2.3 La dynamique de maintenance hyphale semble indépendante du pH

Finalement, Nadir a effectué des mesures de la vitesse d'expansion hyphale et du taux d'expression du rapporteur à pH7 et sous pression induite par la croissance (Fig. 5.9). Le jeu de données à pH 5,5 et pH 7 ne présente pas de différence significative. Le taux de production semble donc varier avec la vitesse de croissance hyphale indépendamment du pH. Ce résultat tend à confirmer que la force d'activation du promoteur de *HWPI* dépend des stimuli durant l'initiation, mais peu

durant la maintenance, qui est un processus relié à une mémoire épigénétique, en tout cas pour les stimuli pH et pression de croissance.

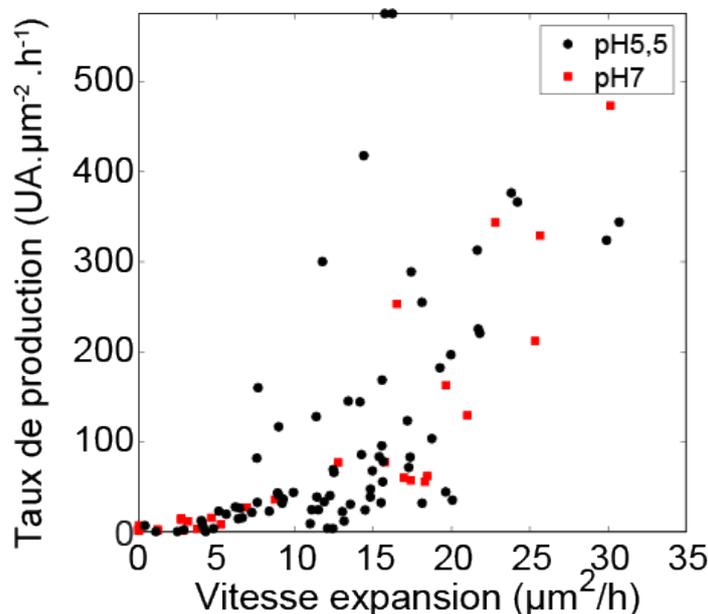


FIGURE 5.9 – Taux d’expression du rapporteur de croissance hyphale en fonction de la vitesse d’expansion, sous pression induite par la croissance à pH5,5 (noir) et pH 7 (rouge).

## 5.3 Conclusion et perspective

### 5.3.1 Conclusion

Dans ce chapitre d’ouverture, nous avons observé que la probabilité de transition levure-hyphe semble dépendre très fortement du pH du milieu perfusé dans notre système. En particulier à pH 7, la plupart des inductions arrivent avant la confluence, lorsque le rinçage par advection du milieu est le plus efficace. Des expériences utilisant le surnageant de culture suggèrent que le renouvellement du milieu durant l’inoculation supporte les inductions avant confluence. Nous émettons l’hypothèse que la molécule de *quorum-sensing* farnésol inhibe ces inductions reliées au renouvellement de milieu et au pH avant confluence, et ce, à une très faible concentration. Ensuite, nous avons vu que la dynamique d’initiation hyphale sous pression semble dépendre du pH, tandis que la dynamique de maintenance semble indépendante. Ces observations viennent consolider les hypothèses suivantes :

1. La transition levure-hyphe semble stochastique en l’absence de farnésol, avec un taux qui dépend du pH,
2. la phase d’initiation est régulée par les stimuli appliqués, et la force d’activation d’un promoteur hyphal compense la limitation biophysique de la pression de croissance,
3. la maintenance constitue un état épigénétique stable, et le rapporteur de croissance hyphale est alors principalement modulé par la croissance, elle-même limitée sous pression.

### 5.3.2 Perspective

A l'issue de son stage, Nadir a débuté une étude du taux d'induction sous advection de milieu dans les chambres avant confluence. Il a observé que le taux d'induction (proportion d'inductions par rapport à la population totale) parvient à environ 22% en 3 h. Le taux d'induction sous sérum à 37°C, et à pH5,5 sous pression de croissance (si l'on élimine l'inhibition du farnésol dans notre modèle) parvient à quasiment 100% en 3 h.

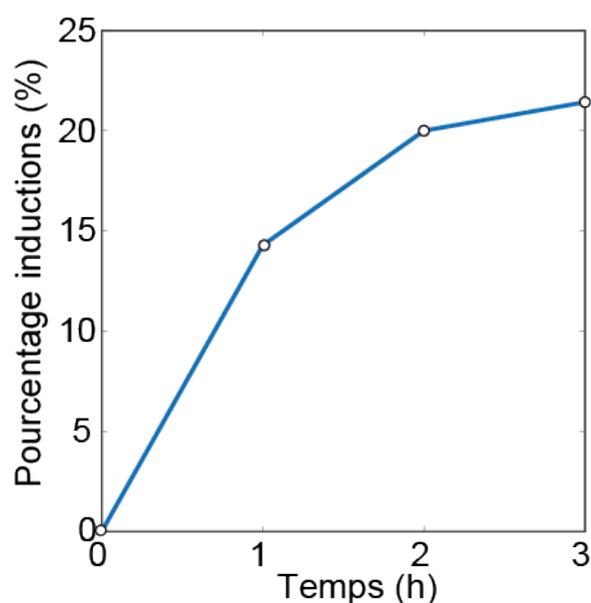


FIGURE 5.10 – Pourcentage d'inductions à pH 7 avant confluence en fonction du temps (nombre d'initiations divisé par le nombre total de cellules observées en champ clair).

Il serait intéressant de poursuivre cette étude couplant advection de milieu, concentration de farnésol et pH. Finalement, l'état morphotypique de *C. albicans* est modulé par un ensemble complexes de signaux. Dans la suite de ce projet, nous souhaitons poursuivre l'étude de cet ensemble d'états et peut être établir un modèle décrivant une combinaison de probabilités reliées aux stimuli appliqués (pH, farnésol). Nous pourrions alors peut-être établir quel signal de l'environnement domine l'autre entre pH et farnésol. Une fois ce modèle calibré, nous pourrions revenir aux observations sous pression de croissance et observer comment la mécanique, couplée à la réponse au pH et au farnésol, module la probabilité d'induire.

Une autre piste à explorer est le faible nombre d'inductions passé la confluence à pH7 et leur répartition uniforme. Ce phénomène nous paraît contre-intuitif étant donné qu'un pH neutre est supposé être plus permissif à la morphogénèse via la voie *RIM101*, évoquée partie 1.2.3. Nous nous attendions à ce que l'addition de deux stress, respectivement inductifs (confluence et pH neutre), augmente le nombre d'inductions.

Une possibilité est que le taux de sécrétion de farnésol par cellule dépend du pH et augmente à pH neutre. En effet, Muramatsu *et al.* ont observé une augmentation du taux de production de cette molécule à pH 7 par rapport au pH 4, chez *S. cerevisiae* [209]. D'autre part, le niveau de production d'alcools aromatiques, dont une autre molécule de *quorum-sensing*, le tyrosol (évoqué partie 1.2.5), dépend aussi du pH chez *C. albicans* [104]. Il serait intéressant de vérifier cette éventuelle modulation en fonction du pH dans le cas du farnésol. Si ce résultat se confirme, peut-être que le peu d'inductions observé à pH 7 passé la confluence, sont des inductions stochastiques

indépendantes du farnésol, d'où leur répartitions uniformes.

Une première expérience envisagée serait de perfuser une puce à pH 7 en ajoutant de la pravastatine, et d'observer si nous retrouvons un comportement prédictible par le modèle proposé Chapitre 3 (augmentation de la probabilité d'induire). Dans le cas où le taux d'induction n'augmenterait pas en ajoutant une dose similaire (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de pravastatine, cela pourrait signifier que le taux de farnésol sécrété est très élevé (dose de pravastatine trop faible) ou qu'un autre phénomène à explorer vient limiter l'initiation passé la confluence. Par exemple, peut-être que les cellules adaptées au pH alcalin sont finalement plus sensibles à la pression de croissance et que la morphogénèse est réprimée rapidement à des pressions relativement faibles.



# Conclusion et perspective générale

Durant ces travaux de thèse, nous nous sommes penchés sur le changement de phénotype levure-hyphe du pathogène opportuniste *C. albicans* dans un environnement physico-chimique et mécanique défini grâce à des dispositifs microfluidiques. D'un point de vue clinique, l'étude de la régulation de la croissance des hyphes sous différentes contraintes est particulièrement intéressante. En effet, la transition réversible levure-hyphe occupe une place prépondérante dans la virulence de ce pathogène. Cette thèse pose également des questions plus fondamentales sur la stabilisation d'un programme épigénétique par un facteur du micro-environnement encore peu étudié chez les levures : la compression mécanique. Aujourd'hui, une multitude de paramètres influençant la morphogénèse de *Candida* ont été caractérisés *in vitro*. Cependant, le phénotype (levure ou hyphe) adopté *in vivo* s'avère souvent différent de celui *in vitro* car il reste difficile de récapituler l'ensemble des composantes et paramètres de micro-environnements complexes rencontrés durant l'infection. Ainsi, un aspect encore souvent négligé et pourtant crucial dans la vie de ce pathogène est la contrainte mécanique.

A l'aide d'outils microfluidiques, nous avons défini un environnement contrôlé et simplifié pour observer la croissance et la transition réversible levure-hyphe sous confinement spatial. Dans notre dispositif microfluidique, la contrainte mécanique provient du simple fait que la croissance de levures sous confinement spatial développe progressivement de la pression. Grâce à cet outil permettant des expériences à haut débit sur cellules vivantes, nous avons observé de façon robuste l'induction d'hyphes sous pression. Par la suite, nous avons observé que l'efficacité d'induction est largement modulée à la fois par la présence de la molécule endogène farnésol, et par le pH. Les résultats expérimentaux suggèrent fortement que l'induction d'hyphes sous pression est principalement modulée par la possibilité d'entrée dans le cycle-cellulaire, et par l'accumulation de farnésol dans la population dense.

Nous avons proposé un modèle décrivant la dynamique d'induction, basé d'une part sur la compétition entre sécrétion de farnésol et l'advection-diffusion en milieu poreux, et d'autre part sur la modulation du cycle-cellulaire. Un point capital est que nous avons supposé qu'en dehors de toute inhibition, l'efficacité d'induction par la mécanique est de  $\alpha$ , ce qui nous permettra de pouvoir mesurer ce paramètre et de le comparer à d'autres contraintes inductives. Notre modèle décrit encore avec une faible précision la répartition spatiale des inductions en fonction de la distance aux canaux d'advection de milieu. Cette limitation suggère que nous appréhendons encore mal la concentration locale de farnésol dans la population dense. Cela nous permet d'effleurer de nouvelles questions intéressantes sur la description du transport en milieu poreux constitué de levures. En particulier, comment évaluer de manière adéquate la résistance hydrodynamique développée par ce type de milieu poreux, composé d'objets polydispersés vivants, qui prolifèrent et se déforment? Le système microfluidique que nous utilisons pourrait apporter un nouvel éclairage à ce type de problématique.

Le modèle proposé prédit cependant la dynamique temporelle des inductions pour les cellules

situées au bord des chambres confinement, où l'advection de milieu est la plus efficace. Ce résultat est central, car il suggère que malgré des conditions physico-chimiques utilisées défavorables à l'initiation d'hyphes (pH acide, température moins élevée que *in vivo*), la probabilité de changement de phénotype sous pression est aussi forte (100%) que pour un stress inductif commun tel que l'addition de sérum à température physiologique (37°C). De plus, à l'aide d'une nouvelle géométrie de dispositifs microfluidiques, nous avons observé que les hyphes maintiennent leur croissance polarisée, même lorsque la contrainte mécanique est relaxée. Cette seconde observation suggère non-seulement que la mécanique favorise l'induction hyphale, mais qu'elle induit un changement épigénétique stable et conservé dans le temps. A la question initiale posée au début de cette thèse : "est-ce que la mécanique déclenche l'induction des hyphes?" nous répondons donc oui, d'après cet ensemble d'observations, et pouvons affirmer que la contrainte mécanique induit une transformation épigénétique robuste et conservée dans le temps.

Des analyses complémentaires à l'échelle de la cellule-unique suggèrent que la force d'activation du programme de croissance des hyphes est positivement régulée sous pression, et compense la limitation biophysique de la compression mécanique. *A contrario*, la pression ne semble pas moduler directement le maintien du programme épigénétique hyphal et la réversion sous pression serait plutôt reliée au ralentissement de la croissance.

Nous avons aussi remarqué que la pression ne limite pas aussi rapidement la croissance des hyphes que celles des levures. Ce résultat intéressant suggère que ces deux phénotypes ne présentent donc pas la même sensibilité à la pression. Au-delà des mécanismes biologiques pouvant entrer en jeu, nos observations suggèrent que les propriétés rhéologiques intracellulaires dans ces deux phénotypes sont différentes, ce qui ouvre également de nouvelles perspectives sur le lien entre propriétés biophysiques (mécanotype) et stabilité phénotype. Une autre thématique également abordée au sein de l'équipe chez *S. cerevisiae* questionne comment l'état biophysique, en particulier la densité intracellulaire, peut conférer un avantage sous pression à une sous-population de cellules. Autrement dit, est-ce que la mécanique peut conférer un avantage sélectif? Au sein de notre équipe, B. Alric a initié une étude sur cette problématique pour différents génotypes chez *S. cerevisiae*. Il serait particulièrement intéressant d'étudier chez *Candida* si l'état phénotypique (donc sans modification du génome) peut conférer un tel avantage d'origine biophysique.

L'ensemble de ces résultats de thèse sont basés sur un seul rapporteur spécifique de la croissance hyphale. Or la dynamique et le délai d'expression varie selon les gènes spécifiques aux hyphes et d'autres promoteurs pourraient être étudiés pour compléter et consolider ces résultats, comme *ECE1* qui code pour une enzyme hydrolytique permettant l'invasion active d'épithélia, ou *HGCI*, une cycline spécifique aux hyphes.

Enfin durant cette thèse nous n'avons pas directement élucidé par quelle(s) voie(s) moléculaire(s) le signal mécanique est intégré chez *Candida*. Nous souhaitons dans la suite explorer les potentielles voies de transduction de ce signal. De plus, nous n'avons effleuré qu'un seul des multiples changements de phénotype dont *Candida* est capable. Un phénomène qui nous paraît important d'étudier est la formation de branchements ou de levures latérales le long des hyphes. Nous avons pu observer la prolifération de ces levures latérales dans notre système, et ce phénomène remarquable pose des questions sur une forme de réversion. Cette réversion est-elle régulée ou non, et est-ce que la mécanique module ce mécanisme prépondérant dans l'infection puisqu'il permet la dissémination?

Ces travaux de thèse posent finalement de nombreuses questions sur le lien entre mécanique et stabilité du phénotype. Les outils analytiques et expérimentaux que nous avons mis en place

ouvrent de nombreuses possibilités, à commencer par l'étude de couplages mécano-chimiques. Au cours de ces travaux, nous avons réalisé l'importance non seulement de la mécanique, mais aussi du couplage entre accumulation et rinçage de *quorum-sensing*, ces deux composantes nous paraissant intriquées. En perspective, nous pourrions revenir sur la formation de biofilms *in vivo*. Qu'est ce qui permet l'émergence d'une sous population d'hyphes, et pourquoi la quantité d'hyphes composant un biofilm semble délimitée et spatialement structurée? Les résultats de cette thèse pourraient apporter un nouvel éclairage à cette thématique. En particulier, l'homéostasie du biofilm pourrait trouver son origine dans le couplage entre mécanique (forces compressives) et accumulation-rinçage de farnésol. Or, ces deux phénomènes découlent de la densification d'une population sous advection de milieu et sont récapitulés dans notre système.

Par la suite, nous pourrions aussi interroger l'impact du confinement spatial sur le changement de phénotype dans d'autres configurations physio-pathologiques. D'une part, il serait intéressant de questionner la réponse à un stimulus dynamique reflétant les fluctuations, notamment mécaniques, du micro-environnement *in vivo*. Dans ce but, nous pourrions nous appuyer sur d'autres types de dispositifs microfluidiques permettant d'appliquer une contrainte axiale sur les cellules en déformant une membrane flexible. Ce type de dispositif faciliterait de plus la caractérisation en *cellule-unique*, cependant il présente un faible débit statistique par rapport au système que nous avons utilisé durant ces travaux de thèse. D'autre part, nous aimerions observer si la géométrie du micro-environnement suffit à elle-seule à expliquer l'initiation d'hyphes *in vivo*. Ce type d'expérience s'oriente vers des topologies plus proches de celles rencontrées *in vivo*. En particulier, nous pourrions nous appuyer sur l'expertise en matériaux biocompatibles et en architecture 3D de l'équipe ELiA (LAAS) pour explorer l'impact du confinement, de la rigidité, et de la géométrie, en reproduisant par exemple les villosités de la paroi intestinale.

Enfin, toujours dans cette optique physio-pathologique, il serait finalement intéressant de caractériser la réponse d'éventuels mutants des voies mécanosensibles dans des cocultures avec des cellules humaines du système immunitaire. Par exemple, nous pourrions étudier si la réponse à la mécanique confère un avantage à la survie durant la phagocytose.

Finalement, les questions soulevées par ces travaux de thèse ouvrent de nouvelles perspectives d'expériences axées sur la physio-pathologie chez ce microbe qui pourraient aboutir sur de nouvelles cibles thérapeutiques si des voies mécanosensibles sont mises en lumière.



# Chapitre 6

## Matériel et méthodes

### 6.1 Culture cellulaire

#### 6.1.1 Souches utilisées

##### Chapitre 2

Nom	Fond génétique	Genotype
<i>P<sub>HWP1</sub>-GFP</i>	CAI-4	<i>HWP1/hwp1::GFP-SAT1</i>

##### Chapitre 3

Nom	Fond génétique	Genotype
<i>P<sub>HWP1</sub>-GFP</i>	CAI-4	<i>HWP1/hwp1::GFP-SAT1</i>
<i>msb2Δ/Δ</i>	CAI-4	<i>msb2::hisG/msb2::hisG</i>
Tubuline-GFP	SC5314	<i>TUB2/tub2::TUB2-GFP</i>

##### Chapitre 4

Nom	Fond génétique	Genotype
<i>P<sub>HWP1</sub>-GFP</i>	CAI-4	<i>HWP1/hwp1::GFP-SAT1</i>
<i>P<sub>ENO1</sub>-GFP</i>	SC5314	<i>ENO1/eno1::EFGFP-NATR</i>
40nm-GEMs	SC5314	<i>INO4/ino4::Pfv-GS-Sapphire-LEU2</i>

##### Chapitre 5

Nom	Fond génétique	Genotype
<i>P<sub>HWP1</sub>-GFP</i>	CAI-4	<i>HWP1/hwp1::GFP-SAT1</i>

### 6.1.2 Milieux de culture utilisés

Pour la culture cellulaire et les expériences, nous utilisons du milieu synthétique complet (*Synthetic Complete*). Ce milieu comprend une source azotée à 6,7 g/L, l'ensemble des acides aminés à 800 mg/L. Ces composants sont dilués dans de l'eau distillée puis la solution est stérilisée à l'autoclave. Ensuite nous y ajoutons une solution de glucose à 20 g/L dans de l'eau distillée, stérilisée par filtration (filtres avec pores de 0,22  $\mu\text{m}$ ). Il est important de ne pas ajouter le glucose avant le passage à l'autoclave car cela modifie la structure de ce composé (il caramélise) ce qui gêne ensuite l'imagerie en fluorescence. Pour les milieux ajustés à pH 5,5 nous ajoutons un tampon MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique) à 10 mM et nous ajustons le pH à température ambiante en ajoutant une solution de soude (NaOH) avant de stériliser par filtration. Pour les milieux ajustés à pH7 nous procédons de la même façon en utilisant un tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) à 10 mM. Ces tampons, de la famille des tampons de Good's, ont notamment l'avantage de permettre d'ajuster le pH sans modifier l'osmolarité de la solution (nous l'avons vérifié à l'aide d'un osmomètre).

### 6.1.3 Culture microbiologique

Les souches sont étalées sur une gélose de milieu synthétique complet à 2% d'agar dans une boîte de Petrie qui est conservée à température ambiante jusqu'à utilisation. De nouvelles colonies sont ainsiensemencées tous les quinze jours environ à partir de stocks conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La veille de l'expérience nous prélevons 2 à 3 colonies que nous cultivons en milieu liquide environ 24 h. Le milieu de culture est le même que celui utilisé durant l'expérience (même composition, même pH). Les colonies sont prélevées à l'aide d'une anse sous environnement stérile (PSM) et nous réalisons une série de 5 à 6 dilutions à 1 :20 dans des tubes de cultures. Le volume total dans chaque tube est d'environ 2 ml. Ensuite les suspensions de cellules sont placées dans un incubateur avec agitation à 200 rpm et thermalisé à  $30^{\circ}\text{C}$ . Juste avant de réaliser l'expérience, nous sélectionnons une suspension dont la densité de cellules n'est pas trop importante en vérifiant la densité optique avec un spectromètre. Nous utilisons typiquement des suspensions à densité optique comprise en 0,1 et 0,2 (cultures en phase exponentielle).

## 6.2 Dispositifs microfluidiques

### 6.2.1 Principe des puces microfluidiques utilisées

Nous utilisons l'élastomère PDMS (polydiméthylsiloxane) qui nous permet de dupliquer rapidement le motif de puce désiré. Ce polymère composé de chaînes  $-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{-}$  est très communément utilisé en microfluidique car il présente des propriétés intéressantes. Il est transparent, perméable aux gaz dont l'oxygène, et biocompatible, ce qui permet la culture de cellules confinées sur de longues périodes. Il est peu onéreux ce qui permet de fabriquer un nombre important de puces d'un même modèle et de tester des géométries variées pour adapter les puces à de nouvelles expériences ou objets biologiques. Les puces sont scellées sur des lamelles de verre de 170  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, compatibles avec l'observation au microscope inversé. Ces puces se décomposent en deux principales parties : des cavités permettant de cultiver et confiner les cellules (que nous appelons "chambres") et des canaux permettant la circulation de milieu liquide.

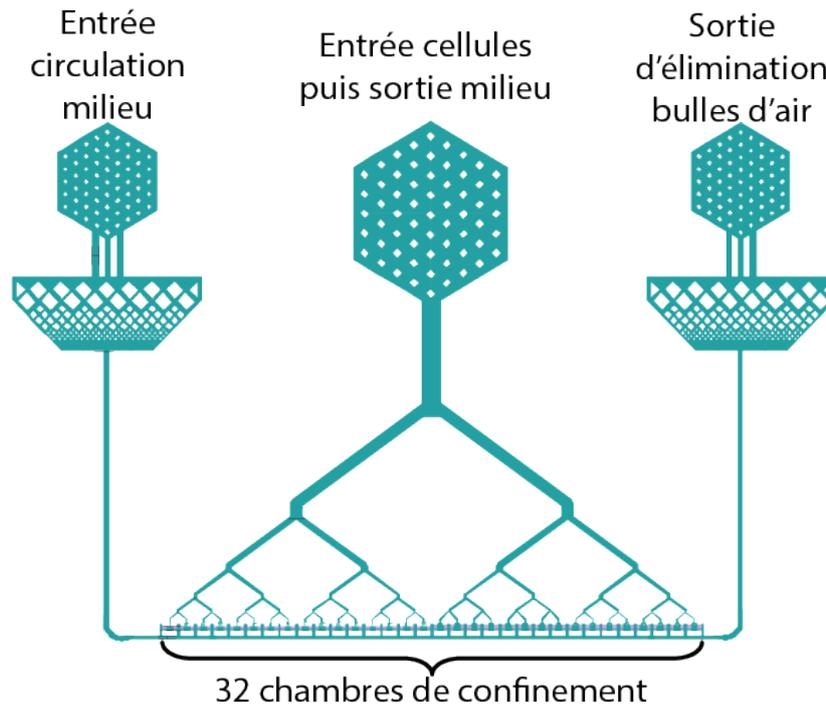


FIGURE 6.1 – Géométrie 2D des puces utilisées. Toute la partie colorée représente les cavités de circulation de milieu liquide. Les tuyaux de perfusion de milieu et d'inoculation de cellules sont branchés à la verticale dans des trous percés au-dessus des cavités "entrée" et "sortie". Le branchement au milieu sert d'abord à inoculer les cellules via l'arborescence en-dessous. Une fois les cellules piégées dans les 32 chambres, cette ouverture est laissée ouverte (résistance hydraulique nulle) pour permettre la perfusion de milieu via "l'entrée milieu". Le milieu de culture est ainsi renouvelé et passe par l'ensemble des chambres en parallèle. Tout à droite, l'ouverture permet d'éliminer l'air. Elle est ensuite scellée par un bouchon (résistance hydraulique infinie) pour que le milieu sous pression soit redirigé vers les chambres.

## Les géométries de puces utilisées

### Organisation générale des puces à valves passives et auto-fermantes

La majorité des puces que nous avons utilisées sont construites sur le même modèle que celle développées par Delarue *et al.* [74]. Ces puces comportent une entrée en "arborescence" (hauteur  $10\ \mu\text{m}$ ) pour inoculer les cellules simultanément dans les 32 chambres ( $40 \times 50 \times 10\ \mu\text{m}$ ). Chaque chambre est aussi reliée au canal de circulation de milieu (hauteur  $10\ \mu\text{m}$ ) via des canaux de section suffisamment faible pour confiner les cellules (section  $0,5 \times 1\ \mu\text{m}$ ).

Dans le cas des chambres à valves passives, la largeur d'entrée des chambres est calibrée ( $6\ \mu\text{m}$ ) afin de retenir stochastiquement les cellules lorsqu'elles remplissent l'espace [74]. Ces chambres présentent différents angles au niveau des entrées afin d'induire des chaînes de forces plus ou moins importantes dans la population de cellules en croissance. Ces transitions de blocages/avalanches ("jamming") permettent des oscillations stochastiques de la pression moyenne développée par les cellules. La fréquence et l'importance de ces oscillations dépendent principalement du rapport entre la taille des cellules et la largeur des entrées, car à forte densité de population les cellules se comportent comme un milieu granulaire [74].

Cependant, ces dispositifs ont été adaptés à la levure *S. cerevisiae* dont la septation est com-

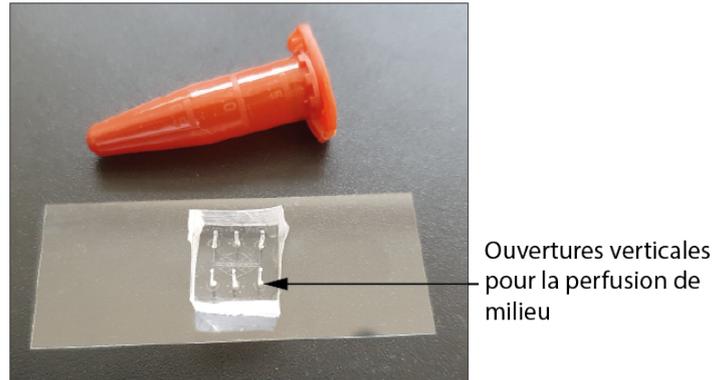


FIGURE 6.2 – Image d'une puce microfluidique en PDMS, scellée sur lamelle de verre, prête à l'emploi.

plète à chaque division cellulaire. Chez *C. albicans* la septation n'est pas toujours complète, cela dépend des conditions physico-chimiques et du fond génétique. Ainsi dans la plupart de nos expériences, nous n'avons pas pu observer d'oscillation de pression pour cette raison. Les cellules semblent former des chaînes en branchements qui ressemblent aux "snow-flakes" évoqués chez *S. cerevisiae* en introduction.

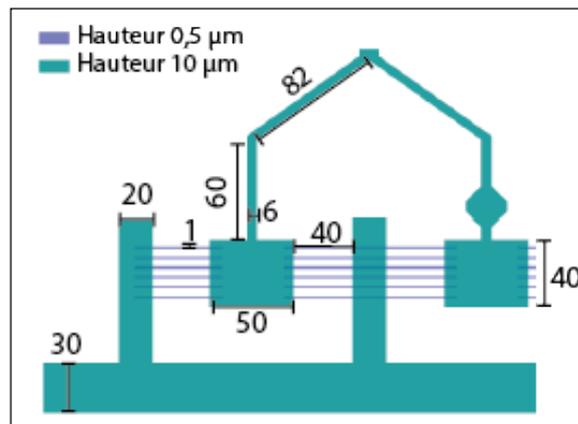


FIGURE 6.3 – Géométrie et dimensions de chambres à valves passives (ici angles de 0° et 45° respectivement). Ces chambres sont reliées en parallèle au canal d'arrivée de milieu (en bas) via des canaux de hauteur sub-micrométrique (en mauve) retenant les cellules. Les cellules sont inoculées via l'arborescence (canaux partant vers le haut de l'image).

Les puces comportent également des chambres à pinces "auto-fermantes". Comme pour les chambres à angle, les cellules prolifèrent et remplissent l'espace libre. Elles remplissent et déforment également les "pinces" et cette déformation entrave et ferme l'entrée, empêchant les cellules de ressortir.

Chaque puce contient deux à quatre reproduction du même modèle ce qui permet de tester simultanément plusieurs conditions de milieu et/ou souches différentes au cours de la même expérience.

#### Valve active horizontale

Pour tenter de remédier au phénomène de blocage des cellules dans les puces à angles, nous avons développé récemment un second type de dispositif dont la fermeture se fait via une valve

active. Ce dispositif repose sur le même principe que celui utilisé par Mishra *et al.* [198]. Il s'agit d'une valve horizontale composée d'un canal, placé au-dessus des chambres contenant les cellules, et séparé par une fine membrane en PDMS. La mise sous pression de la valve permet de la déformer et elle peut être utilisée pour bloquer l'accès à la chambre située en dessous. Il est alors possible de moduler la déformation de cette membrane en utilisant un contrôleur de pression ce qui permet de relaxer la pression développée par les cellules dans la chambre. De plus ce type de dispositif peut être utilisé pour appliquer directement une force uni-axiale sur les cellules, comme évoqué en introduction dans la partie 1.4 [198].

#### *Puces avec compartiments de relaxation de pression pour les hyphes*

Le principe de ces puces est identique à celui des puces à valves passives (Fig. 6.4). Nous avons simplement ajouté une seconde cavité rectangulaire à chacune des 32 chambres. Ces cavités mesurent  $50\ \mu\text{m}$  de large,  $10\ \mu\text{m}$  de haut et  $100$  à  $200\ \mu\text{m}$  de long (selon l'itération du modèle de puce). Elles permettent d'observer la croissance d'hyphes sur plusieurs cycles cellulaires. Elles sont reliées aux chambres de confinement via des canaux dont nous avons calibré la largeur afin qu'ils retiennent les levures mais restent accessibles aux hyphes. Le diamètre moyen des hyphes est de  $1,5$  à  $2\ \mu\text{m}$ , nous avons pris en compte la déformabilité du PDMS et nous avons réduit la section de ces canaux à  $0,8$  de haut pour  $1\ \mu\text{m}$  de large. Enfin ces chambres de relaxation de pression sont aussi reliées au canal de circulation de milieu par des canaux de mêmes dimensions que ceux utilisés pour les chambres de confinement (de section  $0,5 \times 1\ \mu\text{m}$ ).

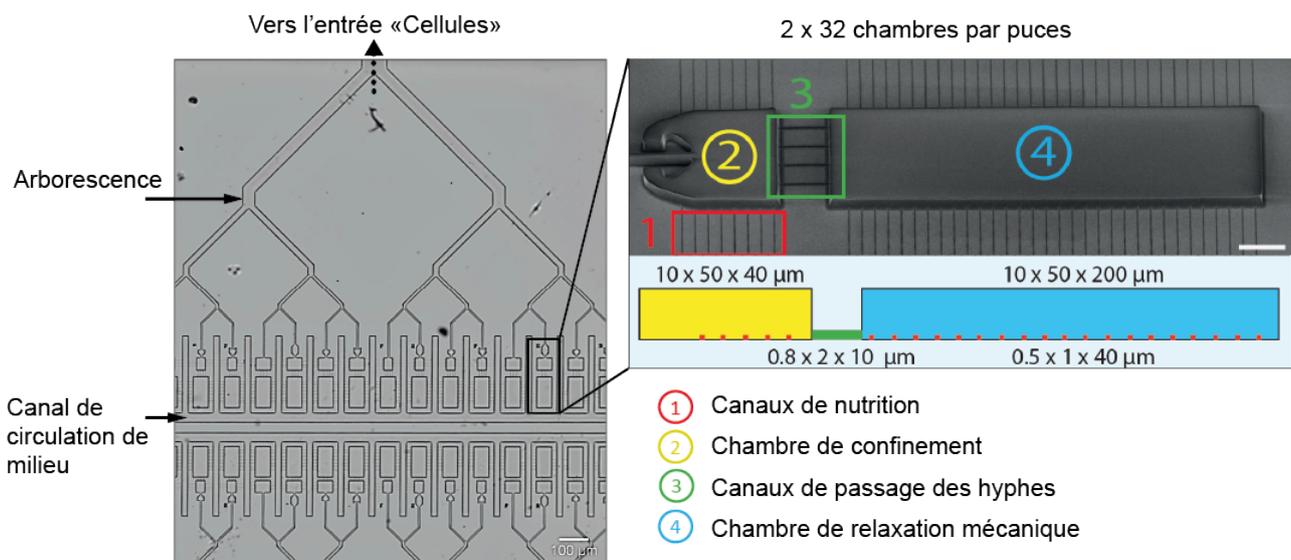


FIGURE 6.4 – À gauche, organisation générale des puces utilisées vue au microscope en champ clair. Nous pouvons voir les deux cotés indépendants composant la puce. Ici les chambres de confinement comportent aussi une chambre de relaxation mécanique pour les hyphes. Barre d'échelle  $100\ \mu\text{m}$ . Encart à droite, vue au microscope électronique à balayage d'une chambre de confinement reliée à la chambre de relaxation. Barre d'échelle  $10\ \mu\text{m}$ .

## 6.2.2 Les étapes de fabrication des puces

La fabrication des puces microfluidiques que nous développons comprends deux grandes étapes : la fabrication d'un moule en résine sur silicium, puis la reproduction par moulage de PDMS

et le scellement par activation des surfaces au plasma. Ce mode de fabrication permet de produire plusieurs dizaines de puces microfluidiques par moule. Nous allons détailler ces étapes ci-dessous.

## Fabrication des puces en PDMS

### Puces à valves verticales

La première étape de fabrication des puces consiste à préparer le PDMS. Pour cela nous mélangeons la base siliconée avec le réticulant au ratio de masses 10 :1. Le mélange liquide et visqueux est ensuite placé sous vide pendant environ une heure à température ambiante, pour éliminer les bulles. En effet, il est nécessaire de dégazer le PDMS pour éviter d'altérer les propriétés optiques de la puce, les bulles pouvant gêner l'observation des cellules. Le PDMS est ensuite coulé sur le moule en résine époxy sur silicium dont la fabrication est détaillée dans la partie suivante (Fig. 6.5). Nous plaçons l'ensemble à 60°C pendant environ 12 heures. Cette montée en température permet de réticuler le PDMS.

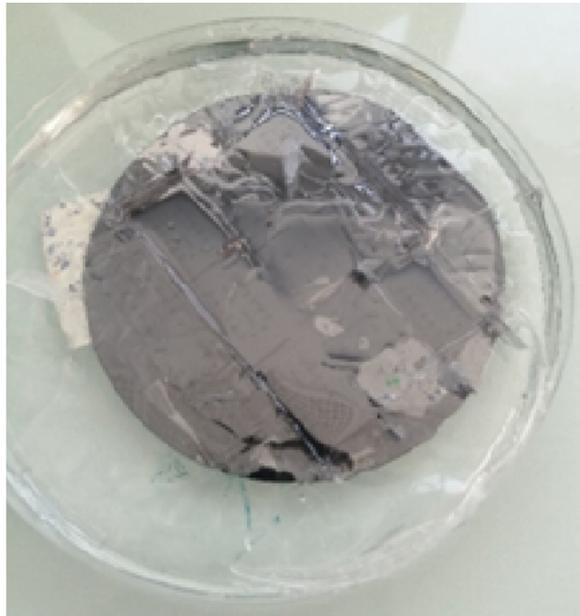


FIGURE 6.5 – PDMS transparent réticulé sur le moule en silicium-résine (en gris) dans une boîte de Petri.

Une fois le PDMS réticulé, chaque puce est découpée et démoulée au scalpel. Nous obtenons des petits cubes de PDMS d'environ 1 cm de côté et de 5 mm d'épaisseur, avec sur l'une des faces une reproduction des motifs du moule qui est transférée. Nous perçons des ouvertures avec un poinçon de biopsie de 0,75 mm de diamètre. Ces ouvertures permettront de perfuser la puce avec du milieu liquide une fois scellée. Nous nettoyons alors les motifs avec de l'isopropanol puis nous séchons les puces à l'aide d'une soufflette à azote comprimé.

Finalement nous scellons les puces sur des lamelles de verres d'épaisseur 170  $\mu\text{m}$ , compatibles avec l'observation sous grossissement  $\times 63$  au microscope. Pour cela, nous activons la surface de la lamelle et de la puce au plasma d'oxygène (Diener PICO) avec les paramètres suivants : puissance à 100% et pression partielle d' $\text{O}_2$  à 0,25 mbar pendant 30 secondes. L'activation des surfaces permet de former des groupes Si-OH les rendant ainsi hydrophiles. Après le plasma, les deux surfaces

sont rapidement mises en contact (motifs contre verre) ce qui forme des liaisons covalentes Si-O-Si. Nous laissons reposer les puces à 60°C pendant au moins 3 heures avant de les utiliser afin de laisser les espèces diffuser et renforcer la liaison des deux surfaces.

Cette dernière étape est particulièrement critique puisque les liaisons entre PDMS et verre doivent résister à la pression du milieu perfusé dans la puce et aux forces développées par les cellules durant l'expérience. Or, ces étapes sont réalisées dans une salle dont l'hygrométrie n'est pas contrôlée ce qui entraîne une faible reproductibilité. Pour pallier à cela, nous adaptons la durée et la pression partielle du plasma si nécessaire, nous fabriquons plusieurs puces en vue d'une expérience, et nous découpons les puces à l'avance pour qu'elles s'oxydent avant l'étape de plasma.

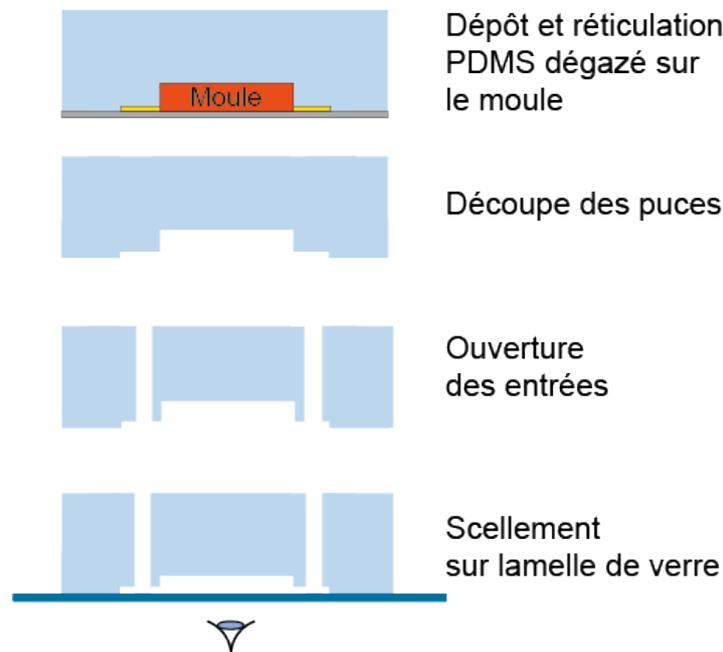


FIGURE 6.6 – Schéma des principales étapes de fabrication des puces microfluidiques par moulage de PDMS et scellement sur lamelle de verre.

#### *Cas particulier des puces à valve active horizontale*

Les puces à valves horizontales doivent être fabriquées en deux étapes afin de former une fine membrane de PDMS qui peut être déformée durant l'expérience. Tout d'abord, nous enduisons d'une fine couche de PDMS dégazé (~20  $\mu\text{m}$ ) le moule comportant les motifs de chambres de confinement à l'aide d'une tournette (2000 tr/min pendant 1 minutes) et nous le laissons réticuler à 60°C pendant 12 h. En parallèle une couche épaisse d'environ 5 mm est également réticulée sur un autre moule, comportant les motifs des valves actives. Ces puces épaisses sont découpées et nous perçons des trous aux entrées des valves avec le poinçon à biopsie de diamètre 0,75 mm. Ensuite, nous activons au plasma  $\text{O}_2$  les puces épaisses, le moule enduit de PDMS de fine épaisseur. Les deux parties sont alignées visuellement à l'aide de mire puis mises en contact pour assurer leur adhérence et sceller la valve. Nous laissons à nouveau l'ensemble à 60°C pendant au moins 3 heures avant de découper et décoller les puces du moule. Nous perçons cette fois les entrées permettant la circulation de milieu liquide et l'inoculation de cellules, et nous scellons le tout sur lamelle de verre par plasma  $\text{O}_2$ .

## Fabrication des moules par photolithographie

Nous fabriquons nos moules dans la salle-blanche de notre laboratoire par photolithographie. Chaque moule se compose d'une galette de Silicium sur laquelle une ou plusieurs épaisseurs de résine époxy photosensible sont déposées (Fig. 6.7). L'étape de photolithographie permet de calquer des motifs géométriques en éclairant les zones souhaitées avec des ultraviolets.

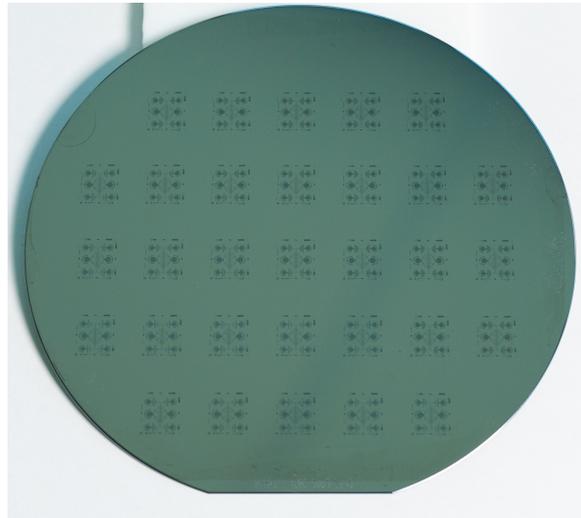


FIGURE 6.7 – Galette de Silicium avec plusieurs répliques de motifs de résine formant chacun une puce microfluidique. (Photo : F. Burckel).

Il existe de nombreux types de résines qui permettent d'obtenir des motifs d'épaisseur et de résolution variées. On décompte deux catégories, les résines négatives et positives selon que l'insolation modifie ou non leurs propriétés chimiques. Dans le cas des résines positives, les zones soumises aux ultra-violets ne peuvent pas réticuler et sont éliminées dans les étapes finales du procédé. Au contraire chez les résines négatives, seules les parties éclairées peuvent être réticulées et conservées. Nous utilisons des résines négatives car elles sont plus résistantes mécaniquement que les résines positives, et adhèrent fortement au silicium. Cela nous permet de pouvoir ré-utiliser le moule fabriqué en limitant son usure.

### Fabrication de niveaux en résine négative SU-8

Le procédé de fabrication d'une seule couche de motifs en résine négative SU-8 se découpe en plusieurs étapes présentées ci-dessous. Ces étapes sont également schématisées dans la figure 6.8.

1. Nettoyage et activation de la surface d'une galette de silicium par plasma  $O_2$  pendant 5 min. Cette étape permet d'améliorer l'adhérence de la résine sur le substrat en éliminant les éventuels défauts et poussières en surface du substrat.
2. Dépôt de la première couche de résine époxy en phase liquide (SU-8 6000.5) par enduction à l'aide d'une tournette à la vitesse de 2000 tr/min pendant 30 secondes. Cette étape permet d'obtenir une fine couche de résine d'épaisseur homogène.
3. Premier recuit. Ces résines contiennent des solvants qui sont éliminés par évaporation durant une étape de recuit d'une minute à  $110^\circ C$  sur plaque chauffant.
4. Insolation de la résine. Le substrat de silicium enduit de résine est placé dans l'appareil MA6-Gen4 afin de réaliser l'étape d'insolation. Un masque en verre et en chrome est placé

au-dessus de la résine. Nous utilisons une résine négative, les motifs à transférer sont transparents aux ultraviolets, en verre. Les motifs les plus fins ont une largeur de seulement  $1\ \mu\text{m}$ , le masque est donc placé contre le substrat sous vide afin de réduire au maximum la distance qui les sépare et améliorer la résolution. L'appareil insole alors la résine au travers du masque avec des LED émettant dans l'ultraviolet ( $365\ \text{nm}$ ) et une dose d'énergie délivrée de  $120\ \text{mJ}/\text{cm}^2$ .

5. Recuit post-insolation. La galette insolée est immédiatement soumise à un second recuit de 2 minutes à  $110^\circ\text{C}$ . Ce recuit complète la réticulation des zones de résine négative insolées.
6. Développement des motifs. Le substrat enduit de résine est plongé dans un bain de solvant qui dissout la résine non-réticulée. Cette étape dure typiquement 3 à 5 minutes et nous utilisons le solvant produit spécifiquement par le fournisseur pour la résine SU-8 (*SU-8 Developer*). La galette est nettoyée à l'isopropanol puis séchée.
7. Caractérisation des motifs. L'aspect des motifs est inspecté visuellement au microscope. Dans le cas de la première couche, qui constitue les canaux de nutrition de nos puces microfluidiques, nous vérifions que la largeur des motifs est bien de  $1\ \mu\text{m}$ . Nous caractérisons également l'épaisseur de résine au profilomètre mécanique afin de vérifier qu'elle est conforme ( $0,5\ \mu\text{m}$ ).

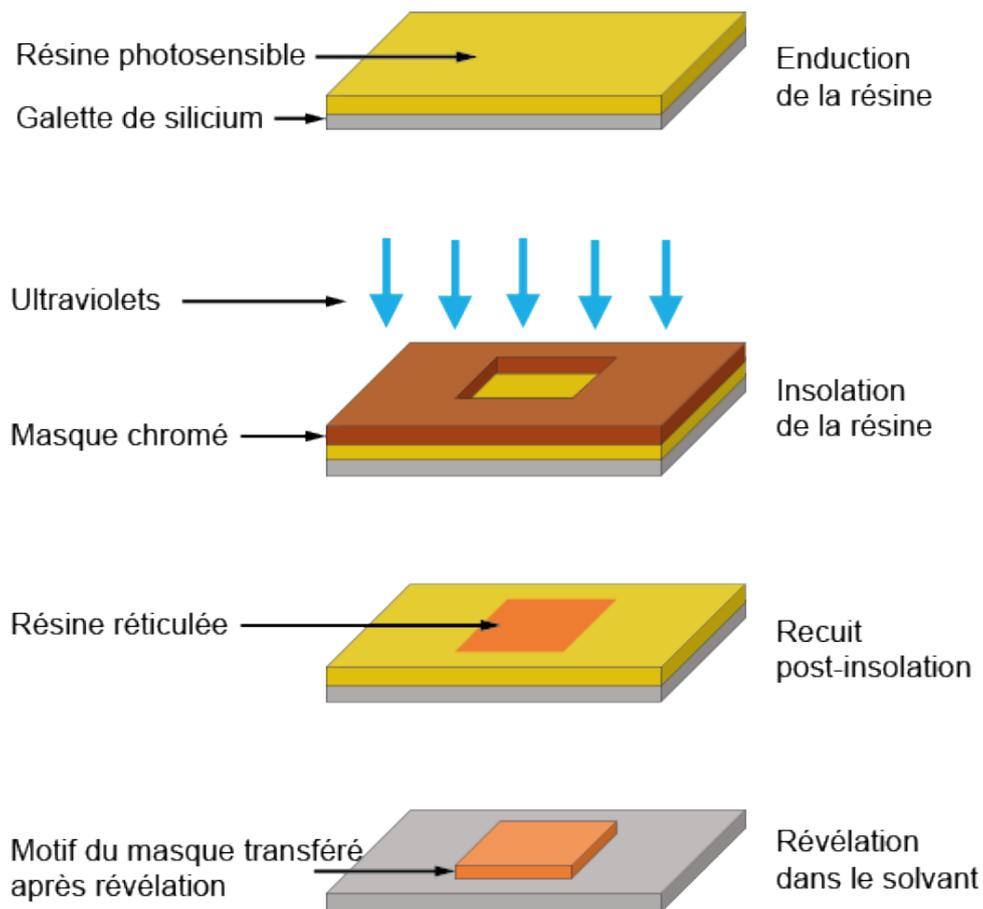


FIGURE 6.8 – Schéma des principales étapes de fabrication d'un premier niveau de moule en résine SU-8 par photolithographie.

Les étapes de fabrication des épaisseurs suivantes se déroulent de manière similaire, en suppri-

mant l'étape de nettoyage plasma. Les paramètres d'insolation et de recuit sont également adaptés à la résine et à l'épaisseur visée. Ces caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous. Les niveaux sont fabriqués par ordre de hauteurs croissantes, de plus il est nécessaire d'aligner les motifs au fil des photolithographies successives, afin d'obtenir l'architecture finale souhaitée. Cet alignement consiste à superposer visuellement des mires, communes aux masques et aux motifs en résine transférés à l'étape précédente à l'aide du microscope de l'appareil d'insolation.

Étapes et paramètres du procédé de photolithographie	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Épaisseur visée ( $\mu\text{m}$ )	0,5	0,8	10
Largeur latérale minimale ( $\mu\text{m}$ )	1	1,5	3
Résine utilisée	6000.5	3002	6005
Vitesse d'enduction (tr/min); durée (s)	2000; 30	3000; 30	1000; 30
Recuit post-enduction température ( $^{\circ}\text{C}$ ); durée (min)	110; 1	95; 3	110; 10
Dose d'insolation ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )	120	180	200
Recuit post-insolation température ( $^{\circ}\text{C}$ ); durée (min)	110; 2	95; 3	110; 2
Durée de développement (min)	3	3	7

Dans le cas des puces avec deux chambres, reliées par des canaux ne laissant passer que les hyphes, les trois niveaux sont réalisés. Pour les puces n'ayant que des chambres de confinement de levures, seuls les niveaux 1 et 3 sont réalisés.

Lorsque tous les niveaux de résine ont été construits, nous effectuons un dernier recuit à  $200^{\circ}\text{C}$  pendant 2 minutes. Cette étape permet d'améliorer la résistance mécanique de la résine et son adhérence au substrat. Enfin, la surface des motifs est oxydée puis silanisée afin de rendre hydrophobe l'ensemble du moule ( $\text{SiO}_2$  5 minutes, FDTS 5 minutes). Cette étape permet de limiter l'adhérence du PDMS avec le moule ce qui facilite l'étape de découpage durant la fabrication des puces microfluidiques.

#### Fabrication de moules en film-sec pour les puces à valve horizontale

Certaines structures comme les valves horizontales ont une résolution latérale peu critique par rapport aux motifs des canaux de nutrition par exemple. En effet, ces structures larges de plusieurs centaines de micromètres ne sont pas destinées à confiner des cellules. En revanche, leurs dimensions latérales importantes nécessitent une épaisseur minimale d'une quinzaine de micromètres pour maintenir un aspect de forme transversal proche de 1 : 1. Ce ratio permet d'éviter l'effondrement et l'adhérence du PDMS sur le substrat durant l'étape de scellement de la puce par plasma, ce qui empêcherait le gonflement de la valve. La fabrication de niveaux épais en résine SU-8 est possible, mais onéreuse. De plus les étapes de recuit sont rallongées car elles nécessitent des montées en température progressives, en rampe. Pour ces raisons, nous avons choisis de fabriquer certains moules, dont les valves horizontales, en film-sec.

Les films secs sont également composés de résine époxy mais sous forme solide. Ils sont fournis en long rouleaux, et plusieurs épaisseurs contrôlées sont disponibles. Nous avons utilisé l'épaisseur  $25\ \mu\text{m}$ . Les étapes de fabrication sont similaires à la SU-8 en phase liquide hormis l'enduction qui est remplacée par la lamination sur la galette de silicium. Ces étapes et leurs paramètres sont résumées ci-dessous :

1. Nettoyage du substrat de silicium par plasma O<sub>2</sub> pendant 5 min.
2. Dépôt du promoteur d'adhérence pour film sec par enduction à l'aide d'une tournette (3000 tr/min, 30s).
3. Dépôt par lamination du film sec. Cela consiste à appliquer progressivement le film-sec contre le substrat en faisant passer l'ensemble entre les deux rouleaux rotatifs d'une lamineuse. Les deux rouleaux sont chauffés à 100°C, ils appliquent une pression de 2,5 bar et tournent à la vitesse de 0,5 m/s.
4. Insolation de la résine. Une fois le film sec adhérent à la galette de silicium nous procédons directement à l'insolation sous masque de chrome de la résine avec une dose de 200 mJ/cm<sup>2</sup> à la longueur d'onde de 365 nm.
5. Recuit post-insolation, à 100°C pendant 5 minutes.
6. Révélation des motifs. Le substrat couvert de résine est plongé dans un solvant (cyclohexanone) afin d'éliminer les zones non-réticulées et révéler les motifs. Nous réalisons deux à trois fois le cycle suivant : bain dans le solvant sous agitation pendant 5 minutes, rinçage à l'isopropanol sans séchage. Nous renouvelons le bain de solvant entre chaque cycle et ces étapes sont répétées jusqu'à complète élimination de toute trace de résine non-réticulée (traces blanches sur le substrat).
7. Caractérisation des dimensions latérales et verticales des motifs.
8. Recuit à 200°C pendant 2 minutes.
9. Silanisation (SiO<sub>2</sub> 5 minutes, FDTS 5 minutes) pour limiter l'adhérence du PDMS.

### 6.2.3 Utilisation des puces microfluidiques

Après avoir présenté les étapes de fabrication des puces, nous allons ici expliquer les étapes nécessaires pour réaliser des expériences de croissance de cellules sous confinement en microscopie. La mise en place de ces expériences comporte trois étapes : l'insertion des cellules, la perfusion avec du milieu nutritif, et l'acquisition automatique d'images au microscope.

#### Inoculation des cellules dans la puce

1. Découpe de deux morceaux de tuyaux en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de diamètre 0,9 mm et de 20 cm de long.
2. L'un des tuyaux est connecté à un support à tubes Fluigent MFCS préalablement rempli avec 1 ml du milieu de culture souhaité.
3. Le tuyau est rempli de liquide par aspiration à la seringue, puis connecté à l'entrée "Milieu" de la puce. Les noms des entrées de la puce sont indiqués sur le schéma figure 6.9-A.
4. 1 mL de cellules en suspension est prélevé du tube de culture à la seringue qui est ensuite connectée au second tuyau. Ce tuyau est rempli en poussant la suspension avec la seringue, puis connecté à l'entrée de l'arborescence de la puce une fois les bulles d'air éliminées.
5. La puce est placée dans l'enceinte thermalisée du microscope pour l'inoculation. Nous commençons par appuyer sur la seringue pour faire entrer les cellules dans les chambres en les observant au microscope. Nous vérifions que l'ensemble des 32 chambres contient environ 2 à 5 cellules (Fig. 6.9-B).

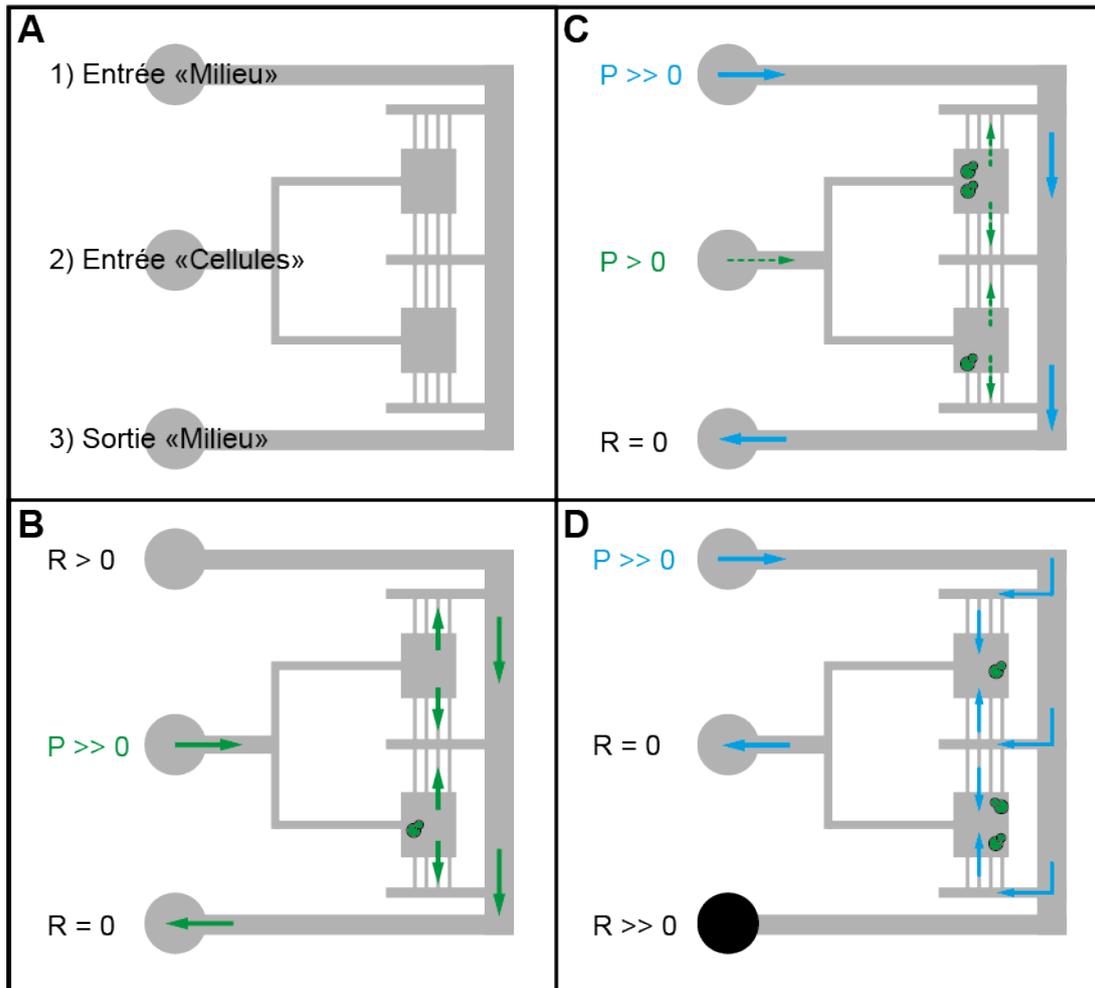


FIGURE 6.9 – Schéma simplifié (deux chambres) des principales étapes de remplissage d'une puce microfluidique. Un seul "coté" est représenté, les puces contiennent deux cotés symétriques et indépendants l'un de l'autre.

6. En maintenant la pression sur la seringue, nous entrons une consigne de pression de 1,2 bar (120 kPa) en sortie du Fluigent afin de faire pénétrer le milieu de culture et chasser l'air (Fig. 6.9-C).
7. Une fois la puce entièrement perfusée, nous plaçons un bouchon à la sortie du canal d'écoulement de milieu, et nous coupons le tuyau contenant la suspension de cellules. La résistance du bouchon étant très grande par rapport à celle des chambres contenant les cellules, le milieu de culture s'écoule alors vers l'entrée de l'arborescence en passant par les cellules (Fig. 6.9-D).

Dans le cas des puces développées par Elodie Couttenier [61] utilisées dans la partie 2.1, nous inoculons différemment. Le milieu de culture est d'abord poussé dans la puce, puis les levures, afin d'éviter qu'elles ne soient au contact de bulles d'air dans le canal de circulation. Un bouchon est ensuite placé sur l'entrée des cellules et la sortie "Milieu" est laissée ouverte pour permettre la circulation de milieu. Enfin, les éventuelles valves actives horizontales sont également connectées au contrôleur de pression Fluigent et sont remplies d'eau. Selon les besoins de l'expérience elles sont soumises à une pression allant de 1 à 4 bar.

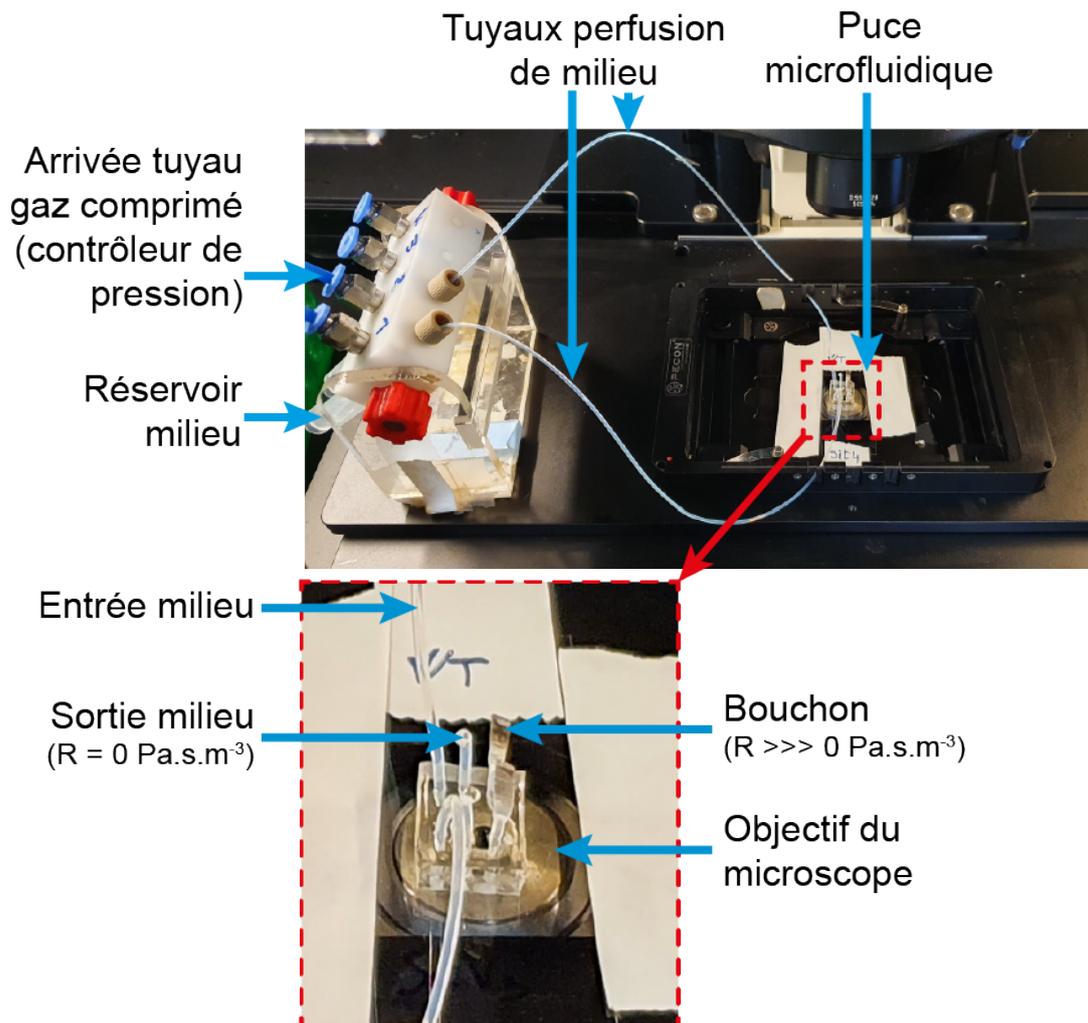


FIGURE 6.10 – Montage de la puce, branchée aux réservoirs de milieu au sein de l'incubateur du microscope. Ces réservoirs (sur le portant à gauche) sont reliés au contrôleur de pression. L'application d'une surpression de gaz dans ces réservoirs scellés "pousse" le milieu contenu dans les tuyaux vers la puce. Chaque tuyau de perfusion de milieu est relié à un côté de la puce, et chaque côté constitue un système fluidique entièrement indépendant de l'autre.

### Acquisition d'images en vidéo-microscopie

Les expériences ont été réalisées avec un microscope Leica DM IRB avec un objectif  $\times 63$  équipé d'une enceinte thermorégulée (LeicaTempControl-37) et d'un système de contrôle du focus afin de réaliser des acquisitions de longues durées.

Les images sont acquises via une caméra Hamatsu CMOS Orca Flash. Les acquisitions en fluorescence ont été faites en imagerie confocale avec un *spinning-disk*<sup>1</sup> (Yokogawa CSU-X1) avec une source laser de puissance nominale de 100mW. Ce mode d'imagerie permet une résolution verticale d'environ 500 nm avec l'objectif  $\times 63$ . Trois filtres ET450/50m, ET525/50m et ET595/50m

1. Un microscope confocal permet la sélection de la lumière provenant d'une tranche optique spécifique de l'échantillon. Pour cela le faisceau lumineux est focalisé en un point au moyen d'un diaphragme. Un second diaphragme est placé en amont du détecteur, dans le plan confocal de l'objectif. De cette façon, seuls les photons provenant du plan focal passent le diaphragme et sont intégrés par le détecteur.

nous ont permis d'intégrer respectivement des signaux DAPI, GFP et RFP avec le miroir Chroma ZT405/488/561/640rpc.

Des images en champ clair sont acquises toutes les 10 minutes durant la durée de l'expérience (en moyenne 12 h). Les images en fluorescence sont acquises (sauf mention spécifique) toutes les 20 minutes à 20% de la puissance du laser pour la GFP (émission à 488 nm) avec un temps d'exposition de 200 ms.

Dans le cas de l'utilisation du fluorophore Dextran RITC (excitation à 610 nm) nous utilisons le filtre ET595/50m, une puissance de laser à 50% et un temps d'exposition de 200 ms.

Dans le cas des expériences imageant la souche *TUB2-GFP* nous prenons une série d'images dans le canal "GFP" (filtre ET525/50m) à 1 minute d'intervalle pendant 5 minutes. Ainsi nous pouvons imager la dynamique des microtubules des cellules. Cela facilite la catégorisation des cellules dans les différentes phases du cycle-cellulaire. En effet selon la position des microtubules dans le plan focal, il peut être difficile de distinguer la morphologie "aster" (interphase) de la morphologie présentée lorsque les *spindle-pole body* sont dédoublés en phases G<sub>2</sub> et S.

Dans le cas de l'acquisition pour imager les déplacements des GEMs dans les cellules et en déduire la diffusion effective, nous imageons les cellules dans le canal GFP avec un temps d'exposition de 10 ms, puissance laser à 100% sans intervalle entre les images. Les trajectoires des GEMs sont ensuite retracées à l'aide du plugin MOSAIC (ImageJ) [248]. L'ensemble des programmes permettant de calculer la moyenne quadratique des déplacements puis la diffusion effective des GEMs ont été développés sous Matlab par M. Delarue [72]. Les concepts utilisés sont également explicités dans le manuscrit de thèse de B. Alric [6].

## 6.3 Analyse d'images

### 6.3.1 Mesure de la pression développée par les cellules dans les chambres

Pour mesurer la pression induite pas la croissance de cellules sous confinement, nous procédons en deux étapes. Nous commençons par calibrer le rapport entre pression appliquée et déformation observée. Ensuite, nous mesurons la déformation des bords de chambres de PDMS remplies de cellules, et nous en déduisons la pression avec le facteur de calibration.

La mesure de pression repose sur deux propriétés importantes du PDMS : il est transparent et c'est un polymère élastique. Le module d'élasticité dépend du rapport massique entre le réticulant et la base, mais aussi de la température de réticulation. Nous utilisons un mélange base-réticulant au ratio 10 :1 réticulé à 60°C de module d'Young de  $\sim 2$  MPa [74]. Nous remplissons d'eau une puce dépourvue de microcanaux (résistance infinie) à l'aide d'un tuyau connecté à l'entrée "Cellules" et à un contrôleur de pression Fluigent. Ensuite nous augmentons la pression de consigne et nous faisons l'acquisition d'images en microscopie en champ clair. Les murs verticaux des chambres s'écartent avec l'augmentation de la pression hydrostatique imposée en entrée de la puce. Nous mesurons la largeur des chambres en fonction de la pression appliquée en entrée. Nous ajustons une courbe de régression linéaire sur ces données afin d'obtenir le facteur de conversion entre déformation et pression hydrostatique dans la chambre (Fig. 6.11-A) par la relation  $(L - L_0) = \alpha \times P$ .

Ensuite nous détectons les bords de chaque chambre remplie de cellules durant les expériences de croissance sous confinement. Pour cela nous utilisons le logiciel Matlab et des programmes que nous avons développé. Brièvement, le code se décompose en quatre étapes (illustrées par la figure 6.11-B) :

- L'utilisateur sélectionne une section d'image qui comprend les bords de la chambre dans la largeur. L'image a préalablement été réorientée afin que ses bords soient toujours horizontaux à l'image.
- Les contours sont détectés avec la fonction "edge" de Matlab, puis l'image est binarisée.
- Les contours verticaux détecté sur l'image correspondent aux de canaux de nutriments et sont éliminés en appliquant la transformation morphologique "imopen".
- Les pixels "blancs" de l'image binarisée sont détectés. La distance moyenne entre les pixels les plus proches des bords haut, et bas, de l'image est calculée (Fig. 6.11-B, flèches). La différence de ces deux valeurs indique la largeur de la chambre et sa variation au cours du temps.

Une fois la largeur de la chambre estimée avec une précision de l'ordre de  $0,5 \mu\text{m}$ , nous calculons simplement la pression par la formule  $P = \alpha \times (L(t) - L_0)$  avec  $L_0$  la largeur moyenne de la chambre détectée avant la confluence, et  $\alpha$  le facteur de conversion ( $\mu\text{m}/\text{MPa}$ ), nous obtenons les courbes présentées figure 6.11-C.

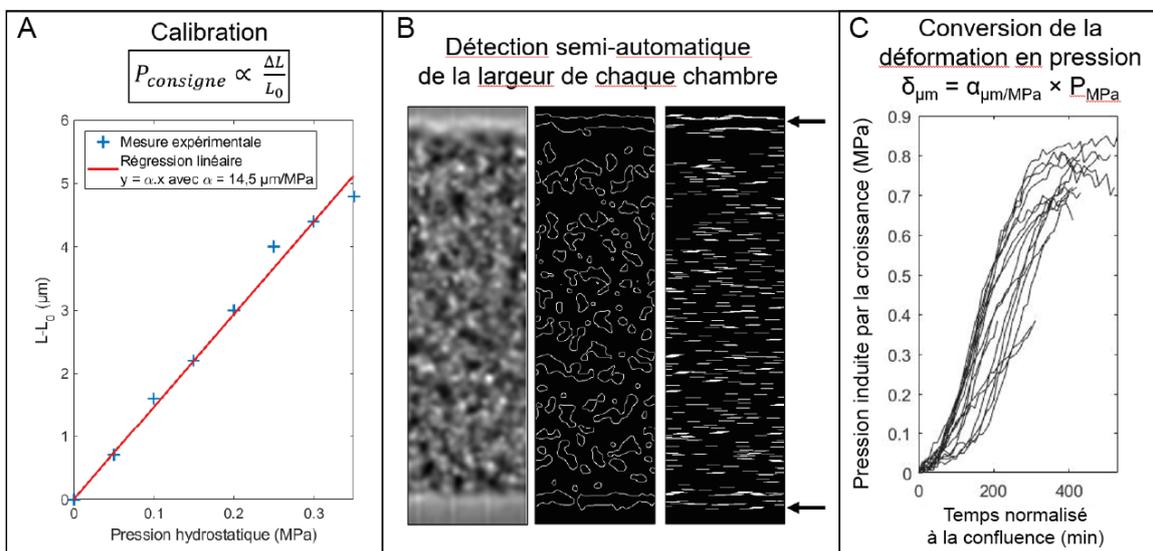


FIGURE 6.11 – (A) Calibration de la mesure de pression à partir de la relation entre la largeur de la chambre  $L-L_0$  ( $\mu\text{m}$ ) et la pression hydrostatique appliquée par le contrôleur de pression. La pente de la régression linéaire est utilisée comme coefficient de conversion, nous avons obtenu la valeur de  $14,5 \mu\text{m}/\text{MPa}$ . (B) Étapes de transformation de l'image par notre script Matlab pour obtenir la largeur de la chambre au cours du temps. (C) Illustration de courbes de pression expérimentales après la conversion de la déformation ( $L-L_0$ ) en pression (MPa). Les courbes de pression sont également décalées temporellement pour que le point initial en abscisse, soit celui de la confluence (chambre remplie de cellules, mais pression encore indétectable).

### 6.3.2 Mesures de fluorescence émise par l'expression de GFP cytoplasmique

Nous allons ici présenter les méthodes utilisées pour mesurer l'intensité de fluorescence émise par la construction  $P_{HWP1}\text{-GFP}$  dans les puces microfluidiques. Pour la mesure de fluorescence émise par l'ensemble des cellules confinées dans une chambre, nous avons pu mettre en place un premier programme Matlab de détection automatique. Pour cela nous avons utilisé la fonction "adaptive threshold" de Matlab, dont nous avons adapté les paramètres par rapport à la taille

des objets à détecter et au bruit de fond (auto-fluorescence émise par des espèces oxydantes présentes dans le cytoplasme des cellules). Ce script nous a permis d'obtenir une aire de chambre occupée par des pixels brillants, c'est-à-dire par des cellules exprimant le rapporteur fluorescent. L'intensité moyenne intégrée sur cette aire nous donne une indication sur la quantité de protéines exprimées, et l'aire, sur le nombre de cellules qui expriment le rapporteur. Nous avons ainsi observé que l'aire relative occupée par des cellules exprimant le rapporteur augmente à la confluence atteint un maximum environ 2 heures plus tard, puis diminue. Nous avons également observé ce phénomène dans le cas de l'intensité moyenne exprimée par ces cellules.

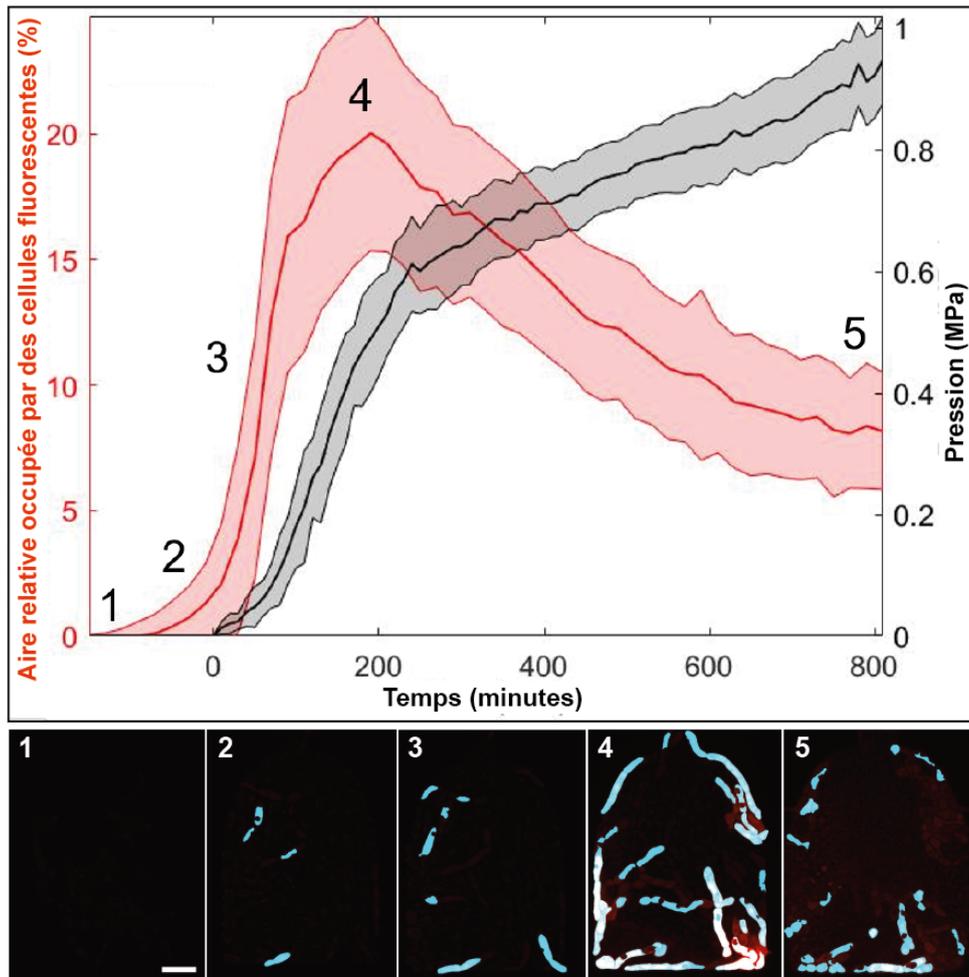


FIGURE 6.12 – Segmentation de l'aire occupée par des pixels brillants dans une chambre, basée sur la fonction "*adaptive threshold*" de Matlab. Ces pixels correspondent à des cellules exprimant le rapporteur de croissance des hyphes utilisé dans la construction  $P_{HWP1}$ -*GFP*. Nous remarquons que la proportion globale de cellules exprimant le rapporteur augmente dès la confluence au temps zéro (1,2,3), pique à 20% 3 h plus tard (4), puis diminue lentement (5) ( $N = 18$  chambres). Des images superposant le masque avec la fluorescence (LUT rouge) illustrent ces différents points de temps. Échelle 10  $\mu\text{m}$ .

Cependant, la segmentation obtenue ne nous a pas permis de différencier les différentes cellules composant chaque hyphe, cette méthode ne nous permet pas non plus d'évaluer l'intensité moyenne par cellule ou de discriminer les initiations. Nous avons observé que le masque obtenu avec "*adaptive threshold*" ne couvre plus les cellules déjà sous forme hyphale sous forte pres-

sion, car celles-ci ont une intensité proche du bruit de fond dans la chambre (Fig 6.12, image 5).

A partir de ces premières observations, avons choisi de découper les différents phénomènes en plusieurs mesures : le décompte des initiations, la mesure de la dynamique d'initiation des levures-mères d'hyphes et la dynamique de maintenance des cellules apicales d'hyphes. Les cellules n'étant pas synchronisées, nous avons opté pour des mesures en *cellule-unique* pour l'étude des dynamiques d'initiation et de maintenance.

L'analyse d'image dans de telles populations, denses et en mouvement car en croissance, reste complexe avec la construction génétique à notre disposition. En effet, il est difficile d'utiliser la segmentation automatique en se basant sur l'intensité, car l'expression du rapporteur est très bruitée et varie dans le temps. Il est également difficile d'utiliser des méthodes de détection basées sur la géométrie des objets car les cellules sont déformées dans les chambres, et présentent des aspects de forme très disparates lorsqu'elles produisent des hyphes.

Nous avons tenté par la suite d'utiliser un fluorophore dilué dans le milieu de culture perfusé dans la puce. Les cellules apparaissent alors en noir et sont entourées de pixels brillants. La construction utilisé produit la protéine GFP, nous avons opté pour un Dextran-RITC (émission dans le canal RFP, excitation à 610 nm). Malheureusement ce produit semble interagir avec la surface du PDMS et s'accumule dans les chambres à forte densité de cellules, gênant là encore la segmentation. Nous avons testé des méthodes basées sur la fonction "watershed" de Matlab sur quelques images. La segmentation des levures arrondies est acceptable, mais les hyphes restent mal segmentés (Fig. 6.13). Dans un soucis d'efficacité, nous avons donc opté pour des mesures manuelles par cellule avec le logiciel ImageJ à partir des images en fluorescence.

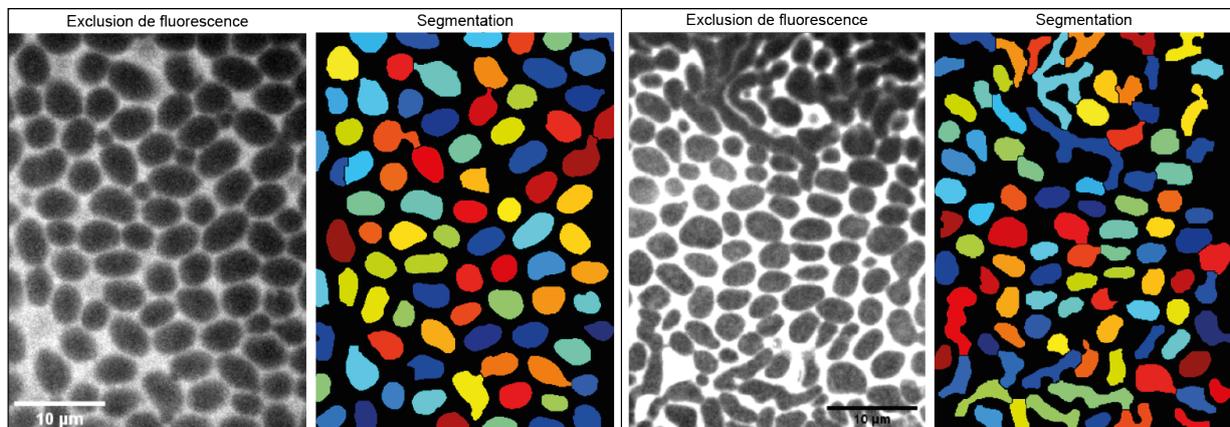


FIGURE 6.13 – Un exemple de segmentation avec du milieu contenant du Dextran-RITC, les cellules apparaissent plus sombres par exclusion de la fluorescence émise par le fluorophore contenu dans le milieu. A gauche, la chambre à faible densité de cellules ne contient que des levures, à droite la chambre contient des hyphes mal segmentées. Échelles 10 µm.

#### *Mesure de l'intensité de fluorescence durant l'initiation*

Dans ce premier cas nous nous focalisons sur les cellules qui commencent à exprimer le rapporteur et émettre de la fluorescence. Nous ne tenons compte que les cellules qui sont sur le plan focal lorsqu'elles débutent l'initiation. Lorsque l'intensité d'une cellule devient plus importante que l'auto-fluorescence du cytoplasme, nous débutons la mesure que nous poursuivons tant que la cellule reste sur le plan focal (voir Fig. 6.14). Nous mesurons l'intensité moyenne de fluorescence sur une portion d'aire cellulaire. Cette mesure est proportionnelle à une concentration volumique

d'espèces fluorescentes ( $\text{UA} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ ). En effet, la tranche optique  $\delta z$  vaut environ 500 nm pour le système d'imagerie utilisé, nous mesurons donc en fait un petit volume  $V = A \times \delta z$ .

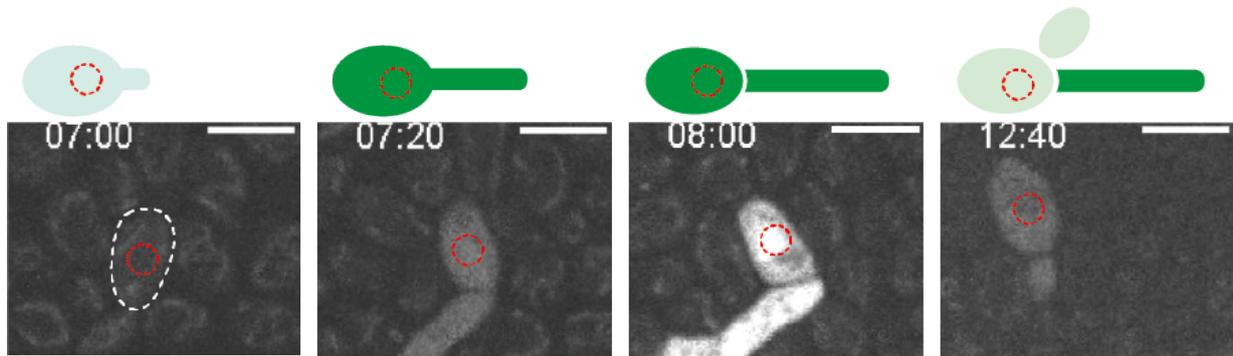


FIGURE 6.14 – Illustration de la mesure d'intensité et d'aire des cellules initiant des hyphes, et qui expriment le rapporteur de croissance hyphale *HWPI* dans les chambres de confinement. Échelle 5  $\mu\text{m}$ .

*Mesure de l'intensité de fluorescence des cellules apicales d'hyphes*

Pour évaluer la dynamique d'expression des cellules apicales d'hyphes, nous débutons la mesure lorsque nous observons une cellule allongée et fluorescente qui se sépare de sa mère (septation). Là encore nous prenons en compte uniquement les cellules situées sur le plan focal au bas de la chambre. Dans ce cas, nous souhaitons également mesurer le taux d'expansion de la cellule apicale, nous mesurons donc l'ensemble de l'aire de la cellule entre deux septations (Fig. 6.15).

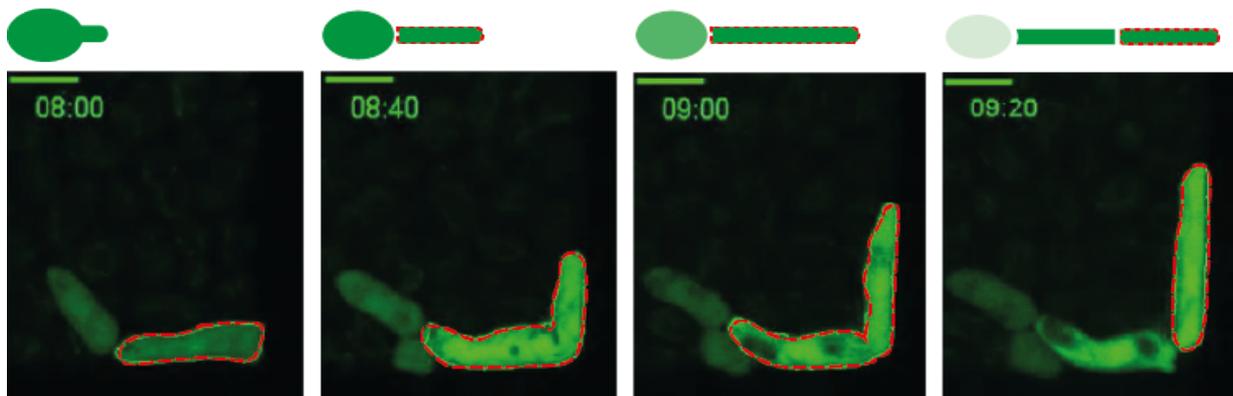


FIGURE 6.15 – Illustration de la mesure d'intensité et d'aire des cellules apicales d'hyphes durant la croissance sous pression induite par la prolifération confinée. Échelles 5  $\mu\text{m}$ .

# Bibliographie

- [1] Riaz Akhtar, Michael J Sherratt, J Kennedy Cruickshank, and Brian Derby. Characterizing the elastic properties of tissues. *Materials Today*, 14(3) :96–105, 2011.
- [2] Mohammed AS Alem, Mohammed DY Oteef, T Hugh Flowers, and L Julia Douglas. Production of tyrosol by candida albicans biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell*, 5(10) :1770–1779, 2006.
- [3] Ricardo S Almeida, Sascha Brunke, Antje Albrecht, Sascha Thewes, Michael Laue, John E Edwards Jr, Scott G Filler, and Bernhard Hube. The hyphal-associated adhesin and invasin als3 of candida albicans mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS pathogens*, 4(11) :e1000217, 2008.
- [4] José Luis Alonso and Wolfgang H Goldmann. Feeling the forces : atomic force microscopy in cell biology. *Life sciences*, 72(23) :2553–2560, 2003.
- [5] Maria F Alonso, Neil AR Gow, Lars P Erwig, and Judith M Bain. Macrophage migration is impaired within candida albicans biofilms. *Journal of Fungi*, 3(3) :31, 2017.
- [6] Baptiste Alric. *Impact des contraintes mécaniques sur la physiologie cellulaire*. PhD thesis, UPS Toulouse-Université Toulouse 3 Paul Sabatier, 2021.
- [7] Baptiste Alric, Cécile Formosa-Dague, Etienne Dague, Liam J Holt, and Morgan Delarue. Macromolecular crowding limits growth under pressure. *Nature Physics*, 18(4) :411–416, 2022.
- [8] David Alsteens, Melissa C Garcia, Peter N Lipke, and Yves F Dufrêne. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(48) :20744–20749, 2010.
- [9] Francisco J Alvarez and James B Konopka. Identification of an n-acetylglucosamine transporter that mediates hyphal induction in candida albicans. *Molecular biology of the cell*, 18(3) :965–975, 2007.
- [10] D Andes, J Nett, P Oschel, R Albrecht, K Marchillo, and A Pitula. Development and characterization of an in vivo central venous catheter candida albicans biofilm model. *Infection and immunity*, 72(10) :6023–6031, 2004.
- [11] Robert A Arkowitz and Martine Bassilana. Recent advances in understanding candida albicans hyphal growth. *F1000Research*, 8, 2019.
- [12] Munehiro Asally, Mark Kittisopikul, Pau Rué, Yingjie Du, Zhenxing Hu, Tolga Çağatay, Andra B Robinson, Hongbing Lu, Jordi Garcia-Ojalvo, and Gürol M Süel. Localized cell death focuses mechanical forces during 3d patterning in a biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46) :18891–18896, 2012.
- [13] Jürg Bähler. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu. Rev. Genet.*, 39 :69–94, 2005.

- [14] George S Baillie and L Julia Douglas. Effect of growth rate on resistance of candida albicans biofilms to antifungal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(8) :1900–1905, 1998.
- [15] George S Baillie and L Julia Douglas. [48] candida biofilms and their susceptibility to anti-fungal agents. *Methods in enzymology*, 310 :644–656, 1999.
- [16] George S Baillie and L Julia Douglas. Role of dimorphism in the development of candida albicans biofilms. *Journal of medical microbiology*, 48(7) :671–679, 1999.
- [17] Caroline V Bamford, Anita d’Mello, Angela H Nobbs, Lindsay C Dutton, M Margaret Vickerman, and Howard F Jenkinson. Streptococcus gordonii modulates candida albicans biofilm formation through intergeneric communication. *Infection and immunity*, 77(9) :3696–3704, 2009.
- [18] Mohua Banerjee, Delma S Thompson, Anna Lazzell, Patricia L Carlisle, Christopher Pierce, Carlos Monteagudo, José L Lopez-Ribot, and David Kadosh. Ume6, a novel filament-specific regulator of candida albicans hyphal extension and virulence. *Molecular biology of the cell*, 19(4) :1354–1365, 2008.
- [19] Caroline J Barelle, Erin A Bohula, Stephen J Kron, Deborah Wessels, David R Soll, Annette Schäfer, Alistair J P Brown, and Neil A R Gow. Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of candida albicans. *EUKARYOTIC CELL*, 2 :398–410, 2003.
- [20] Caroline J Barelle, Claire L Manson, Donna M MacCallum, Frank C Odds, Neil AR Gow, and Alistair JP Brown. Gfp as a quantitative reporter of gene regulation in candida albicans. *Yeast*, 21(4) :333–340, 2004.
- [21] Caroline J Barelle, Mathias L Richard, Claude Gaillardin, Neil A R Gow, and Alistair J P Brown. Candida albicans vac8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *EUKARYOTIC CELL*, 5 :359–367, 2006.
- [22] Karen J Barwell, Jacob H Boysen, Wenjie Xu, and Aaron P Mitchell. Relationship of dfg16 to the rim101p ph response pathway in saccharomyces cerevisiae and candida albicans. *Eukaryotic cell*, 4(5) :890–899, 2005.
- [23] Matteo Bassetti, Enrico Maria Treccarichi, Elda Righi, Maurizio Sanguinetti, Francesca Bisio, Brunella Posteraro, Ornella Soro, Roberto Cauda, Claudio Viscoli, and Mario Tumbarello. Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. survey in 2 italian university hospitals. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 58 :325–331, 7 2007.
- [24] Martine Bassilana, Julie Hopkins, and Robert A Arkowitz. Regulation of the cdc42/cdc24 gtpase module during candida albicans hyphal growth. *Eukaryotic cell*, 4(3) :588–603, 2005.
- [25] Virginia Basso, Christophe d’Enfert, Sadri Znaidi, and Sophie Bachellier-Bassi. From genes to networks : the regulatory circuitry controlling candida albicans morphogenesis. *Fungal Physiology and Immunopathogenesis*, pages 61–99, 2018.
- [26] Martin Bastmeyer, Holger B Deising, and Clemens Bechinger. Force exertion in fungal infection. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 31 :321, 2002.
- [27] Clemens Bechinger, Karl-Friedrich Giebel, Martin Schnell, Paul Leiderer, Holger B Deising, and Martin Bastmeyer. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science*, 285(5435) :1896–1899, 1999.
- [28] Tina Bedekovic and Alexandra C Brand. Microfabrication and its use in investigating fungal biology. *Molecular Microbiology*, 117(3) :569–577, 2022.

- [29] Catherine M Bendel, Donavon J Hess, Robb M Garni, Michelle Henry-Stanley, and Carol L Wells. Comparative virulence of candida albicans yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Critical care medicine*, 31(2) :501–507, 2003.
- [30] Doris Berchtold, Manuele Piccolis, Nicolas Chiaruttini, Isabelle Riezman, Howard Riezman, Aurélien Roux, Tobias C Walther, and Robbie Loewith. Plasma membrane stress induces re-localization of slm proteins and activation of torc2 to promote sphingolipid synthesis. *Nature cell biology*, 14(5) :542–547, 2012.
- [31] Alexander Berrocal, Claudia Oviedo, Kenneth W Nickerson, and José Navarrete. Quorum sensing activity and control of yeast-mycelium dimorphism in ophiostoma floccosum. *Bio-technology letters*, 36(7) :1503–1513, 2014.
- [32] Kajal Biswas and Joachim Morschhäuser. The mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in candida albicans. *Molecular microbiology*, 56(3) :649–669, 2005.
- [33] S. Biswas, P. Van Dijck, and A. Datta. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of candida albicans. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71 :348–376, 6 2007.
- [34] Subhrajit Biswas, Patrick Van Dijck, and Asis Datta. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of candida albicans. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2) :348–376, 2007.
- [35] Calvin Boon, Yinyue Deng, Lian-Hui Wang, Yawen He, Jin-Ling Xu, Yang Fan, Shen Q Pan, and Lian-Hui Zhang. A novel dsf-like signal from burkholderia cenocepacia interferes with candida albicans morphological transition. *The ISME journal*, 2(1) :27–36, 2008.
- [36] Janet Braam. In touch : plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist*, 165(2) :373–389, 2005.
- [37] Alexandra Brand, Scott Shanks, Vanessa MS Duncan, Meng Yang, Kevin Mackenzie, and Neil AR Gow. Hyphal orientation of candida albicans is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Current Biology*, 17(4) :347–352, 2007.
- [38] Alexandra C. Brand, Emma Morrison, Stephen Milne, Sara Gonia, Cheryl A. Gale, and Neil A.R. Gow. Cdc42 gtpase dynamics control directional growth responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 :811–816, 2014.
- [39] Burkhard R Braun, W Steven Head, Ming X Wang, and Alexander D Johnson. Identification and characterization of tup1-regulated genes in candida albicans. *Genetics*, 156(1) :31–44, 2000.
- [40] Burkhard R Braun and Alexander D Johnson. Control of filament formation in candida albicans by the transcriptional repressor tup1. *Science*, 277(5322) :105–109, 1997.
- [41] Burkhard R Braun, David Kadosh, and Alexander D Johnson. Nrg1, a repressor of filamentous growth in c. albicans, is down-regulated during filament induction. *The EMBO journal*, 20(17) :4753–4761, 2001.
- [42] Kimberly M Brothers, Remi L Gratacap, Sarah E Barker, Zachary R Newman, Ashley Norum, and Robert T Wheeler. NADPH oxidase-driven phagocyte recruitment controls candida albicans filamentous growth and prevents mortality. *PLoS pathogens*, 9(10) :e1003634, 2013.
- [43] Douglas H Brown Jr, Angela D Giusani, Xi Chen, and Carol A Kumamoto. Filamentous growth of candida albicans in response to physical environmental cues and its regulation by the unique czf1 gene. *Molecular microbiology*, 34(4) :651–662, 1999.

- [44] Samuel J Buff, R McLelland, Harry A Gallis, Richard Matthay, and Charles E Putman. *Candida albicans* pneumonia : radiographic appearance. *American Journal of Roentgenology*, 138(4) :645–648, 1982.
- [45] Jeffrey Buffo, Michael A Herman, and David R Soll. A characterization of ph-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 85(1) :21–30, 1984.
- [46] David Caballero-Lima, Iliyana N Kaneva, Simon P Watton, Peter E Sudbery, and C Jeremy Craven. The spatial distribution of the exocyst and actin cortical patches is sufficient to organize hyphal tip growth. *Eukaryotic Cell*, 12(7) :998–1008, 2013.
- [47] Julia Calderon, Martin Zavrel, Enrico Ragni, William A Fonzi, Steffen Rupp, and Laura Popolo. Phr1, a ph-regulated gene of *Candida albicans* encoding a glucan-remodelling enzyme, is required for adhesion and invasion. *Microbiology*, 156(8) :2484–2494, 2010.
- [48] RD Cannon and WL Chaffin. Oral colonization by *Candida albicans*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 10(3) :359–383, 1999.
- [49] Arturo Casadevall and Liise Anne Pirofski. Host-pathogen interactions : Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and Immunity*, 68 :6511–6518, 2000.
- [50] Mirianas Chachisvilis, Yan-Liang Zhang, and John A Frangos. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42) :15463–15468, 2006.
- [51] W LaJean Chaffin. The relationship between yeast cell size and cell division in *Candida albicans*. *Canadian journal of microbiology*, 30(2) :192–203, 1984.
- [52] Cho X.J. Chan and Peter N. Lipke. Role of force-sensitive amyloid-like interactions in fungal catch bonding and biofilms. *Eukaryotic Cell*, 13 :1136–1142, 9 2014.
- [53] Hao Chen, Masaki Fujita, Qinghua Feng, Jon Clardy, and Gerald R Fink. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(14) :5048–5052, 2004.
- [54] Hui Chen, Xuedong Zhou, Biao Ren, and Lei Cheng. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1) :337–348, 2020.
- [55] Delma S Childers, Gabriela M Avelar, Judith M Bain, Daniel E Larcombe, Arnab Pradhan, Susan Budge, Helen Heaney, and Alistair JP Brown. Impact of the environment upon the *Candida albicans* cell wall and resultant effects upon immune surveillance. *The Fungal Cell Wall*, pages 297–330, 2019.
- [56] Eve Wai Ling Chow, Li Mei Pang, and Yue Wang. From jekyll to hyde : The yeast–hyphal transition of *Candida albicans*. *Pathogens*, 10(7) :859, 2021.
- [57] Ian A Cleary, Priyadarshini Mulabagal, Sara M Reinhard, Nishant P Yadev, Craig Murdoch, Martin H Thornhill, Anna L Lazzell, Carlos Monteagudo, Derek P Thomas, and Stephen P Saville. Pseudohyphal regulation by the transcription factor *rfg1p* in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 9(9) :1363–1373, 2010.
- [58] Ian A Cleary and Stephen P Saville. An analysis of the impact of *nrg1* overexpression on the *Candida albicans* response to specific environmental stimuli. *Mycopathologia*, 170(1) :1–10, 2010.
- [59] Garry T Cole, Kalpathi R Seshan, Keiko T Lynn, and Marcello Franco. Gastrointestinal candidiasis : histopathology of *Candida*-host interactions in a murine model. *Mycological research*, 97(4) :385–408, 1993.

- [60] Fabien Cottier and Rebecca A Hall. Face/off : The interchangeable side of candida albicans. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9 :471, 2020.
- [61] Elodie Couttenier. *Candida albicans sur puce microfluidique : réponse des hyphes aux contraintes physiques et cycle cellulaire*. PhD thesis, Université Paris sciences et lettres, 2020.
- [62] Helen Crampin, Kenneth Finley, Maryam Gerami-Nejad, Helen Court, Cheryl Gale, Judith Berman, and Peter Sudbery. Candida albicans hyphae have a spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *Journal of Cell Science*, 118 :2935–2947, 7 2005.
- [63] Sandra Cruz, Sofía Muñoz, Elvira Manjón, Patricia García, and Yolanda Sanchez. The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins mtl2 and wsc1 act by turning on the gtp ase rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiologyopen*, 2(5) :778–794, 2013.
- [64] Paul J Cullen, Walid Sabbagh, Ellie Graham, Molly M Irick, Erin K van Olden, Cassandra Neal, Jeffrey Delrow, Lee Bardwell, and George F Sprague. A signaling mucin at the head of the cdc42-and mapk-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes & development*, 18(14) :1695–1708, 2004.
- [65] N Shane Cutler, Xuewen Pan, Joseph Heitman, and Maria E Cardenas. The tor signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Molecular biology of the cell*, 12(12) :4103–4113, 2001.
- [66] Alessandra da Silva Dantas, Kathy K Lee, Ingrida Raziunaite, Katja Schaefer, Jeanette Wagner, Bhawna Yadav, and Neil AR Gow. Cell biology of candida albicans–host interactions. *Current opinion in microbiology*, 34 :111–118, 2016.
- [67] Frederic Dalle, Betty Wächtler, Coralie L'Ollivier, Gudrun Holland, Norbert Bannert, Duncan Wilson, Catherine Labruère, Alain Bonnin, and Bernhard Hube. Cellular interactions of candida albicans with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular microbiology*, 12(2) :248–271, 2010.
- [68] Karla J Daniels, Thyagarajan Srikantha, Claude Pujol, Yang-Nim Park, and David R Soll. Role of tec1 in the development, architecture, and integrity of sexual biofilms of candida albicans. *Eukaryotic cell*, 14(3) :228–240, 2015.
- [69] Amber Davis-Hanna, Amy E Piispanen, Lubomira I Stateva, and Deborah A Hogan. Farnesol and dodecanol effects on the candida albicans ras1-camp signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Molecular microbiology*, 67(1) :47–62, 2008.
- [70] Flavia De Bernardis, Fritz A Muhlschlegel, Antonio Cassone, and William A Fonzi. The ph of the host niche controls gene expression in and virulence of candida albicans. *Infection and immunity*, 66(7) :3317–3325, 1998.
- [71] Jérôme Dehullu, Claire Valotteau, Philippe Herman-Bausier, Melissa Garcia-Sherman, Maximilian Mittelviehhaus, Julia A Vorholt, Peter N Lipke, and Yves F Dufrêne. Fluidic force microscopy demonstrates that homophilic adhesion by candida albicans als proteins is mediated by amyloid bonds between cells. *Nano letters*, 19(6) :3846–3853, 2019.
- [72] Morgan Delarue, Gregory P Brittingham, Stefan Pfeffer, IV Surovtsev, S Pinglay, KJ Kennedy, M Schaffer, JI Gutierrez, D Sang, G Poterewicz, et al. mtorc1 controls phase separation and the biophysical properties of the cytoplasm by tuning crowding. *Cell*, 174(2) :338–349, 2018.

- [73] Morgan Delarue, Jörn Hartung, Carl Schreck, Pawel Gniewek, Lucy Hu, Stephan Herminghaus, and Oskar Hallatschek. Self-driven jamming in growing microbial populations. *Nature physics*, 12(8) :762–766, 2016.
- [74] Morgan Delarue, Jörn Hartung, Carl Schreck, Pawel Gniewek, Lucy Hu, Stephan Herminghaus, and Oskar Hallatschek. Self-driven jamming in growing microbial populations. *Nature Physics*, 12 :762–766, 8 2016.
- [75] Morgan Delarue, Gregory Poterewicz, Ori Hoxha, Jessica Choi, Wonjung Yoo, Jona Kayser, Liam Holt, and Oskar Hallatschek. The smush pathway is essential for survival during growth-induced compressive mechanical stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114 :13465–13470, 2017.
- [76] Morgan Delarue, Gregory Poterewicz, Ori Hoxha, Jessica Choi, Wonjung Yoo, Jona Kayser, Liam Holt, Oskar Hallatschek, and David A. Weitz. Scwish network is essential for survival under mechanical pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114 :13465–13470, 12 2017.
- [77] R Delfanti, L Conti, E Fronti, G Ratti, A Zangrandi, P Capelli, et al. Candida albicans bone rib osteomyelitis due to previous systemic candidiasis. *International Journal of Pulmonary & Respiratory Sciences*, 3(4) :66–68, 2018.
- [78] Jigar V Desai. Candida albicans hyphae : from growth initiation to invasion. *Journal of Fungi*, 4(1) :10, 2018.
- [79] Jigar V Desai, Shaoji Cheng, Tammy Ying, M Hong Nguyen, Cornelius J Clancy, Frederick Lanni, and Aaron P Mitchell. Coordination of candida albicans invasion and infection functions by phosphoglycerol phosphatase rhr2. *Pathogens*, 4(3) :573–589, 2015.
- [80] Jigar V Desai and Aaron P Mitchell. Candida albicans biofilm development and its genetic control. *Microbial Biofilms*, pages 99–114, 2015.
- [81] Prashant R Desai, Lasse van Wijlick, Dagmar Kurtz, Mateusz Juchimiuk, and Joachim F Ernst. Hypoxia and temperature regulated morphogenesis in candida albicans. *PLoS genetics*, 11(8) :e1005447, 2015.
- [82] Emily F Dixon and Rebecca A Hall. Noisy neighbourhoods : quorum sensing in fungal-polymicrobial infections. *Cellular Microbiology*, 17(10) :1431–1441, 2015.
- [83] Anne E Dodson and Jasper Rine. Heritable capture of heterochromatin dynamics in saccharomyces cerevisiae. *Elife*, 4 :e05007, 2015.
- [84] Tiina Drell, Triin Lillsaar, Lea Tummeleht, Jaak Simm, Anu Aaspõllu, Edda Väin, Ivo Saarma, Andres Salumets, Gilbert G.G. Donders, and Madis Metsis. Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age estonian women. *PLoS ONE*, 8, 1 2013.
- [85] Vincent Dupres, David Alsteens, Sabrina Wilk, Benjamin Hansen, Jürgen J Heinisch, and Yves F Dufrêne. The yeast wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nature chemical biology*, 5(11) :857–862, 2009.
- [86] Tarek Elhasi and Anders Blomberg. Integrins in disguise-mechanosensors in saccharomyces cerevisiae as functional integrin analogues. *Microbial Cell*, 6(8) :335, 2019.
- [87] Brice Enjalbert and Malcolm Whiteway. Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during candida albicans resumption of growth. *Eukaryotic cell*, 4(7) :1203–1210, 2005.

- [88] Lars P Erwig and Neil AR Gow. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*, 14(3) :163–176, 2016.
- [89] Catherine Even, Christian Marlière, Jean-Marc Ghigo, Jean-Marc Allain, Alba Marcellan, and Eric Raspaud. Recent advances in studying single bacteria and biofilm mechanics. *Advances in Colloid and Interface Science*, 247 :573–588, 2017.
- [90] Qinghua Feng, Eric Summers, Bing Guo, and Gerald Fink. Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in candida albicans. *Journal of bacteriology*, 181(20) :6339–6346, 1999.
- [91] Charles Willard Fetter, Thomas B Boving, and David K Kreamer. *Contaminant hydrogeology*, volume 500. Prentice hall Upper Saddle River, NJ, 1999.
- [92] Jonathan S Finkel and Aaron P Mitchell. Genetic control of candida albicans biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2) :109–118, 2011.
- [93] Jonathan Sewell Finkel and Aaron P Mitchell. Biofilm formation in candida albicans. *Candida and candidiasis*, pages 299–315, 2011.
- [94] Kenneth R. Finley and Judith Berman. Microtubules in candida albicans hyphae drive nuclear dynamics and connect cell cycle progression to morphogenesis. *Eukaryotic Cell*, 4 :1697–1711, 10 2005.
- [95] William A Fonzi. Phr1 and phr2 of candida albicans encode putative glycosidases required for proper cross-linking of  $\beta$ -1, 3- and  $\beta$ -1, 6-glucans. *Journal of bacteriology*, 181(22) :7070–7079, 1999.
- [96] C Formosa, Marion Schiavone, Hélène Martin-Yken, JM François, RE Duval, and Etienne Dague. Nanoscale effects of caspofungin against two yeast species, saccharomyces cerevisiae and candida albicans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(8) :3498–3506, 2013.
- [97] C Förster, S Marienfeld, F Wendisch, and R Kr amer. Adaptation of the filamentous fungus ashbya gossypii to hyperosmotic stress : different osmoreponse to nacl and mannitol stress. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(2) :219–226, 1998.
- [98] Aaron T. Frank, Caleen B. Ramsook, Henry N. Otoo, Cho Tan, Gregory Soybelman, Jason M. Rauceo, Nand K. Gaur, Stephen A. Klotz, and Peter N. Lipke. Structure and function of glycosylated tandem repeats from candida albicans als adhesins. *Eukaryotic Cell*, 9 :405–414, 3 2010.
- [99] Han Gao, Chen-chen Gao, Tian-tian Wang, Lei Gao, Guang-wen Li, Liang-yun Jin, Cheng-wei He, Bo-ya Wang, Lucia Zhang, Yue-xin Guo, et al. An unexpected alteration colonic mucus appearance in the constipation model via an intestinal microenvironment. *Microscopy and Microanalysis*, pages 1–14, 2022.
- [100] Susana García-Sánchez, Abigail L Mavor, Claire L Russell, Silvia Argimon, Paul Dennison, Brice Enjalbert, and Alistair JP Brown. Global roles of ssn6 in tup1- and nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, candida albicans. *Molecular biology of the cell*, 16(6) :2913–2925, 2005.
- [101] Steffen Geisel, Eleonora Secchi, and Jan Vermant. The role of surface adhesion on the macroscopic wrinkling of biofilms. *Elife*, 11 :e76027, 2022.
- [102] Patrick Gervais, Christophe Abadie, and Paul Molin. Fungal turgor pressure is directly involved in the hyphal growth rate. *Microbiological research*, 154(1) :81–87, 1999.

- [103] Mahmoud A. Ghannoum, Richard J. Jurevic, Pranab K. Mukherjee, Fan Cui, Masoumeh Sikaroodi, Ammar Naqvi, and Patrick M. Gillevet. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLOS Pathogens*, 6 :e1000713, 1 2010.
- [104] Suman Ghosh, Bessie W Kebaara, Audrey L Atkin, and Kenneth W Nickerson. Regulation of aromatic alcohol production in candida albicans. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23) :7211–7218, 2008.
- [105] Jonathan Gomez-Raja and Dana A Davis. The  $\beta$ -arrestin-like protein rim8 is hyperphosphorylated and complexes with rim21 and rim101 to promote adaptation to neutral-alkaline ph. *Eukaryotic cell*, 11(5) :683–693, 2012.
- [106] Neil AR Gow and Graham W Gooday. Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of candida albicans. *Microbiology*, 128(9) :2187–2194, 1982.
- [107] Neil A.R. Gow and Bernhard Hube. Importance of the candida albicans cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology*, 15 :406–412, 8 2012.
- [108] Neil A.R. Gow, Y. Knox, C. A. Munro, and W. D. Thompson. Infection of chick chorioallantoic membrane (cam) as a model for invasive hyphal growth and pathogenesis of candida albicans. *Medical Mycology*, 41 :331–338, 8 2003.
- [109] Paolo Antonio Grossi. Clinical aspects of invasive candidiasis in solid organ transplant recipients. *Drugs*, 69 Suppl 1 :15–20, 2009.
- [110] Megha Gulati and Clarissa J Nobile. Candida albicans biofilms : development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5) :310–321, 2016.
- [111] Luciene Setsuko Akimoto Gunther, Helen Priscila Rodrigues Martins, Fabrícia Gimenes, André Luelsdorf Pimenta de Abreu, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, and Terezinha Inez Estivalet Svidzinski. Prevalence of candida albicans and non-albicans isolates from vaginal secretions : comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *São paulo medical journal*, 132 :116–120, 2014.
- [112] Steven B Haase and Steven I Reed. Evidence that a free-running oscillator drives gl events in the budding yeast cell cycle. *Nature*, 401(6751) :394–397, 1999.
- [113] Heather E Hallen-Adams and Mallory J Suhr. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3) :352–358, 2017.
- [114] Armin Haupt, Dmitry Ershov, and Nicolas Minc. A positive feedback between growth and polarity provides directional persistency and flexibility to the process of tip growth. *Current Biology*, 28(20) :3342–3351, 2018.
- [115] SP Hawser, GS Baillie, and L Julia Douglas. Production of extracellular matrix by candida albicans biofilms. *Journal of medical microbiology*, 47(3) :253–256, 1998.
- [116] Idit Hazan, Marisa Sepulveda-Becerra, and Haoping Liu. Hyphal elongation is regulated independently of cell cycle in candida albicans. *Molecular biology of the cell*, 13(1) :134–145, 2002.
- [117] Betty Hebecker, Sebastian Vlaic, Theresia Conrad, Michael Bauer, Sascha Brunke, Mario Kapitan, Jörg Linde, Bernhard Hube, and Ilse D. Jacobsen. Dual-species transcriptional profiling during systemic candidiasis reveals organ-specific host-pathogen interactions. *Scientific Reports*, 6, 11 2016.

- [118] Manon Henry, Anaïs Burgain, Faiza Tebbji, and Adnane Sellam. Transcriptional control of hypoxic hyphal growth in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, page 1129, 2022.
- [119] Vida Ho, Philippe Herman-Bausier, Christopher Shaw, Karen A. Conrad, Melissa C. Garcia-Sherman, Jeremy Draghi, Yves F. Dufrene, Peter N. Lipke, and Jason M. Rauceo. An amyloid core sequence in the major *Candida albicans* adhesin Als1p mediates cell-cell adhesion. *mBio*, 10, 10 2019.
- [120] Harvey C Hoch, Richard C Staples, Brian Whitehead, Jerry Comeau, and Edward D Wolf. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in uromyces. *Science*, 235(4796) :1659–1662, 1987.
- [121] Christian Hoffmann, Serena Dollive, Stephanie Grunberg, Jun Chen, Hongzhe Li, Gary D. Wu, James D. Lewis, and Frederic D. Bushman. Archaea and fungi of the human gut microbiome : Correlations with diet and bacterial residents. *PLOS ONE*, 8 :e66019, 6 2013.
- [122] Deborah A Hogan, Áshild Vik, and Roberto Kolter. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology*, 54(5) :1212–1223, 2004.
- [123] Oliver R Homann, Jeanselle Dea, Suzanne M Noble, and Alexander D Johnson. A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS genetics*, 5(12) :e1000783, 2009.
- [124] Jacob M Hornby, Sarah M Jacobitz-Kizzier, Donna J McNeel, Ellen C Jensen, David S Treves, and Kenneth W Nickerson. Inoculum size effect in dimorphic fungi : extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratomyces ulmi*. *Applied and environmental microbiology*, 70(3) :1356–1359, 2004.
- [125] Jacob M Hornby, Ellen C Jensen, Amber D Lisec, Joseph J Tasto, Brandon Jahnke, Richard Shoemaker, Patrick Dussault, and Kenneth W Nickerson. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology*, 67(7) :2982–2992, 2001.
- [126] Jacob M Hornby, Bessie W Kebaara, and Kenneth W Nickerson. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans* : cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(7) :2366–2369, 2003.
- [127] Jacob M. Hornby and Kenneth W. Nickerson. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 :2305–2307, 6 2004.
- [128] Lihua Hou, Yi Chen, Chengjie Ma, Juan Liu, Chen Ligu, and Aimin Ma. Effects of environmental factors on dimorphic transition of the jelly mushroom *Tremella fuciformis*. *Cryptogamie, Mycologie*, 32(4) :421–428, 2011.
- [129] LL Hoyer and JE Hecht. The *ALS5* gene of *Candida albicans* and analysis of the *ALS5p* N-terminal domain. *Yeast*, 18(1) :49–60, 2001.
- [130] Cheol-Sang Hwang, Jang-Hyun Oh, Won-Ki Huh, Hyung-Soon Yim, and Sa-Ouk Kang. Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 47(4) :1029–1043, 2003.
- [131] Shane Jacobeen, Jennifer T Pentz, Elyes C Graba, Colin G Brandys, William C Ratcliff, and Peter J Yunker. Cellular packing, mechanical stress and the evolution of multicellularity. *Nature physics*, 14(3) :286–290, 2018.

- [132] Rakesh K Jain, John D Martin, and Triantafyllos Stylianopoulos. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annual review of biomedical engineering*, 16 :321, 2014.
- [133] Sung Jae Jang, Kyeongju Lee, Bomi Kwon, Hyun Ju You, and GwangPyo Ko. Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of candida albicans. *Scientific reports*, 9(1) :1–9, 2019.
- [134] Sabrina Jenull, Michael Tscherner, Megha Gulati, Clarissa J Nobile, Neeraj Chauhan, and Karl Kuchler. The candida albicans hir histone chaperone regulates the yeast-to-hyphae transition by controlling the sensitivity to morphogenesis signals. *Scientific reports*, 7(1) :1–17, 2017.
- [135] Malin EV Johansson, Jenny K Gustafsson, Jessica Holmén-Larsson, Karolina S Jabbar, Lijun Xia, Hua Xu, Fayez K Ghishan, Frederic A Carvalho, Andrew T Gewirtz, Henrik Sjövall, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*, 63(2) :281–291, 2014.
- [136] GC Johnston, JR Pringle, and Leland H Hartwell. Coordination of growth with cell division in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Experimental cell research*, 105(1) :79–98, 1977.
- [137] Sophie Joly, Ning Ma, Jeffrey J Sadler, David R Soll, Suzanne L Cassel, and Fayyaz S Sutterwala. Cutting edge : Candida albicans hyphae formation triggers activation of the nlrp3 inflammasome. *The Journal of Immunology*, 183(6) :3578–3581, 2009.
- [138] Laura A Jones and Peter E Sudbery. Spitzenkorper, exocyst, and polarisome components in candida albicans hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties. *Eukaryotic cell*, 9(10) :1455–1465, 2010.
- [139] M Anaul Kabir, Mohammad Asif Hussain, and Zulfiqar Ahmad. Candida albicans : a model organism for studying fungal pathogens. *International Scholarly Research Notices*, 2012, 2012.
- [140] David Kadosh and Alexander D Johnson. Induction of the candida albicans filamentous growth program by relief of transcriptional repression : a genome-wide analysis. *Molecular biology of the cell*, 16(6) :2903–2912, 2005.
- [141] JC Kapteyn, LL Hoyer, JE Hecht, WH Müller, A Andel, AJ Verkleij, M Makarow, H Van Den Ende, and FM Klis. The cell wall architecture of candida albicans wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Molecular microbiology*, 35(3) :601–611, 2000.
- [142] Aspasia Katragkou, Michael J Kruhlak, Maria Simitsopoulou, Athanasios Chatzimoschou, Anna Taparkou, Catherine J Cotten, Fotini Paliogianni, Eudoxia Diza-Mataftsi, Chaido Tsantali, Thomas J Walsh, et al. Interactions between human phagocytes and candida albicans biofilms alone and in combination with antifungal agents. *The Journal of infectious diseases*, 201(12) :1941–1949, 2010.
- [143] Jona Kayser, Carl F Schreck, QinQin Yu, Matti Gralka, and Oskar Hallatschek. Emergence of evolutionary driving forces in pattern-forming microbial populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 373(1747) :20170106, 2018.
- [144] Bessie W Kebaara, Melanie L Langford, Dhammika H M L P Navarathna, Raluca Dumitru, Kenneth W Nickerson, and Audrey L Atkin. Candida albicans tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *EUKARYOTIC CELL*, 7 :980–987, 2008.
- [145] Bessie W Kebaara, Melanie L Langford, Dhammika HMLP Navarathna, Raluca Dumitru, Kenneth W Nickerson, and Audrey L Atkin. Candida albicans tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryotic cell*, 7(6) :980–987, 2008.

- [146] Sanghee Kim, Eunkyung Kim, Dong-Sun Shin, Heonjoong Kang, and Ki-Bong Oh. Evaluation of morphogenic regulatory activity of farnesoic acid and its derivatives against candida albicans dimorphism. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 12(6) :895–898, 2002.
- [147] Bruce S Klein and Brad Tebbets. Dimorphism and virulence in fungi. *Current opinion in microbiology*, 10(4) :314–319, 2007.
- [148] Torsten Klengel, Wei-Jun Liang, James Chaloupka, Claudia Ruoff, Klaus Schröppel, Julian R Naglik, Sabine E Eckert, Estelle Gewiss Mogensen, Ken Haynes, Mick F Tuite, et al. Fungal adenyl cyclase integrates co2 sensing with camp signaling and virulence. *Current Biology*, 15(22) :2021–2026, 2005.
- [149] Frans M Klis, Chris G de Koster, and Stanley Brul. Cell wall-related bionumbers and bioestimates of saccharomyces cerevisiae and candida albicans. *Eukaryotic cell*, 13(1) :2–9, 2014.
- [150] Christian Kock, Yves F Dufrêne, and Jürgen J Heinisch. Up against the wall : is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Applied and environmental microbiology*, 81(3) :806–811, 2015.
- [151] P. Koehler, M. Stecher, O. A. Cornely, D. Koehler, M. J.G.T. Vehreschild, J. Bohlius, H. Wisplinghoff, and J. J. Vehreschild. Morbidity and mortality of candidaemia in europe : an epidemiologic meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 25 :1200–1212, 10 2019.
- [152] Rajendra Prasad Koirala, Sita Dawanse, and Nurapati Pantha. Diffusion of glucose in water : A molecular dynamics study. *Journal of Molecular Liquids*, 345 :117826, 2022.
- [153] Erna M Kojic and Rabih O Darouiche. Candida infections of medical devices. *Clinical microbiology reviews*, 17(2) :255–267, 2004.
- [154] Naga Venkatesh Kollu and Dennis R LaJeunesse. Cell rupture and morphogenesis control of the dimorphic yeast candida albicans by nanostructured surfaces. *ACS omega*, 6(2) :1361–1369, 2021.
- [155] Annika König, Bernhard Hube, and Lydia Kasper. The dual function of the fungal toxin candidalysin during candida albicans—macrophage interaction and virulence. *Toxins*, 12(8) :469, 2020.
- [156] Keiko Kono, Yasushi Saeki, Satoshi Yoshida, Keiji Tanaka, and David Pellman. Proteasomal degradation resolves competition between cell polarization and cellular wound healing. *Cell*, 150(1) :151–164, 2012.
- [157] Michael Kruppa. Quorum sensing and candida albicans. *Mycoses*, 52(1) :1–10, 2009.
- [158] Michael Kruppa, Bastiaan P Krom, Neeraj Chauhan, Adrienne V Bambach, Ronald L Cihlar, and Richard A Calderone. The two-component signal transduction protein chk1p regulates quorum sensing in candida albicans. *Eukaryotic Cell*, 3(4) :1062–1065, 2004.
- [159] Rajiv K Kulkarni and Kenneth W Nickerson. Nutritional control of dimorphism in ceratocystis ulmi. *Experimental Mycology*, 5(2) :148–154, 1981.
- [160] Bart Jan Kullberg and Maiken C. Arendrup. Invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373 :1445–1456, 10 2015.
- [161] Carol A. Kumamoto, Mark S. Gresnigt, and Bernhard Hube. The gut, the bad and the harmless : Candida albicans as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Current Opinion in Microbiology*, 56 :7–15, 8 2020.

- [162] Melanie L Langford, Audrey L Atkin, and Kenneth W Nickerson. Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by candida albicans. *Future microbiology*, 4(10) :1353–1362, 2009.
- [163] Melanie L Langford, Jessica C Hargarten, Krista D Patefield, Elizabeth Marta, Jill R Blankenship, Saranna Fanning, Kenneth W Nickerson, and Audrey L Atkin. Candida albicans czf1 and efg1 coordinate the response to farnesol during quorum sensing, white-opaque thermal dimorphism, and cell death. *Eukaryotic cell*, 12(9) :1281–1292, 2013.
- [164] Olivier Leroy, Jean Pierre Gangneux, Philippe Montravers, Jean Paul Mira, François Gouin, Jean Pierre Sollet, Jean Carlet, Jacques Reynes, Michel Rosenheim, Bernard Regnier, and Olivier Lortholary. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive candida infections in critical care : a multicenter, prospective, observational study in france (2005-2006). *Critical care medicine*, 37 :1612–1618, 2009.
- [165] Roger R Lew. How does a hypha grow? the biophysics of pressurized growth in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 9(7) :509–518, 2011.
- [166] Roger R Lew and Shanar Nasserifar. Transient responses during hyperosmotic shock in the filamentous fungus neurospora crassa. *Microbiology*, 155(3) :903–911, 2009.
- [167] Leanne E Lewis, Judith M Bain, Christina Lowes, Collette Gillespie, Fiona M Rudkin, Neil AR Gow, and Lars-Peter Erwig. Stage specific assessment of candida albicans phagocytosis by macrophages identifies cell wall composition and morphogenesis as key determinants. *PLoS pathogens*, 8(3) :e1002578, 2012.
- [168] Mingchun Li, Samuel J Martin, Vincent M Bruno, Aaron P Mitchell, and Dana A Davis. Candida albicans rim13p, a protease required for rim101p processing at acidic and alkaline phs. *Eukaryotic cell*, 3(3) :741–751, 2004.
- [169] SK Linden, P Sutton, NG Karlsson, V Korolik, and MA McGuckin. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal immunology*, 1(3) :183–197, 2008.
- [170] Allia K Lindsay, Aurélie Deveau, Amy E Piispanen, and Deborah A Hogan. Farnesol and cyclic amp signaling effects on the hypha-to-yeast transition in candida albicans. *Eukaryotic cell*, 11(10) :1219–1225, 2012.
- [171] Allia K Lindsay, Aurélie Deveau, Amy E Piispanen, and Deborah A Hogan. Farnesol and cyclic amp signaling effects on the hypha-to-yeast transition in candida albicans. 2012.
- [172] Chengcheng Liu, Yulong Niu, Xuedong Zhou, Keke Zhang, Lei Cheng, Mingyun Li, Yuqing Li, Renke Wang, Yi Yang, and Xin Xu. Hyperosmotic response of streptococcus mutans : from microscopic physiology to transcriptomic profile. *BMC microbiology*, 13(1) :1–9, 2013.
- [173] Yuwei Liu, Xiaodong Gong, Moxiao Li, Helong Si, Qihui Zhou, Xingchen Liu, Yu Fan, Xiaoyu Zhang, Jianmin Han, Shouqin Gu, et al. Effect of osmotic stress on the growth, development and pathogenicity of setosphaeria turcica. *Frontiers in Microbiology*, 12 :706349, 2021.
- [174] Hsiu Jung Lo, Julia R. Köhler, Beth Didomenico, David Loebenberg, Anthony Cacciapuoti, and Gerald R. Fink. Nonfilamentous c. albicans mutants are avirulent. *Cell*, 90 :939–949, 1997.
- [175] Albert S Lossinsky, Ambrose Jong, Milan Fiala, Muhammad Mukhtar, Karolyn F Buttle, and Marylou Ingram. The histopathology of candida albicans invasion in neonatal rat tissues and in the human blood-brain barrier in culture revealed by light, scanning, transmission and immunoelectron microscopy scanning. *Histology and histopathology*, 2006.

- [176] Yang Lu, Chang Su, and Haoping Liu. A gata transcription factor recruits hda1 in response to reduced tor1 signaling to establish a hyphal chromatin state in candida albicans. *PLoS pathogens*, 8(4) :e1002663, 2012.
- [177] Yang Lu, Chang Su, and Haoping Liu. Candida albicans hyphal initiation and elongation. *Trends in microbiology*, 22(12) :707–714, 2014.
- [178] Yang Lu, Chang Su, Norma V. Solis, Scott G. Filler, and Haoping Liu. Synergistic regulation of hyphal elongation by hypoxia, co<sub>2</sub>, and nutrient conditions controls the virulence of candida albicans. *Cell Host and Microbe*, 2013.
- [179] Yang Lu, Chang Su, Ohimai Unoje, and Haoping Liu. Quorum sensing controls hyphal initiation in candida albicans through ubr1-mediated protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 :1975–1980, 2 2014.
- [180] Yang Lu, Chang Su, Allen Wang, and Haoping Liu. Hyphal development in candida albicans requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *PLoS biology*, 9(7) :e1001105, 2011.
- [181] Yang Lu, Chang Su, Allen Wang, and Haoping Liu. Hyphal development in candida albicans requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *PLoS Biology*, 9, 7 2011.
- [182] DWR Mackenzie. Serum tube identification of candida albicans. *Journal of Clinical Pathology*, 15(6) :563–565, 1962.
- [183] Mykola M Maidan, Larissa De Rop, Joke Serneels, Simone Exler, Steffen Rupp, H elene Tourneu, Johan M Thevelein, and Patrick Van Dijck. The g protein-coupled receptor gpr1 and the g $\alpha$  protein gpa2 act through the camp-protein kinase a pathway to induce morphogenesis in candida albicans. *Molecular biology of the cell*, 16(4) :1971–1986, 2005.
- [184] Eugenio Mancera, Isabel Nocedal, Stephen Hammel, Megha Gulati, Kaitlin F Mitchell, David R Andes, Clarissa J Nobile, Geraldine Butler, and Alexander D Johnson. Evolution of the complex transcription network controlling biofilm formation in candida species. *Elife*, 10 :e64682, 2021.
- [185] Ronny Martin, Daniela Albrecht-Eckardt, Sascha Brunke, Bernhard Hube, Kerstin H unniger, and Oliver Kurzai. A core filamentation response network in candida albicans is restricted to eight genes. *PloS one*, 8(3) :e58613, 2013.
- [186] Ronny Martin, Gary P Moran, Ilse D Jacobsen, Antje Heyken, Jenny Domey, Derek J Sullivan, Oliver Kurzai, and Bernhard Hube. The candida albicans-specific gene eed1 encodes a key regulator of hyphal extension. *PloS one*, 6(4) :e18394, 2011.
- [187] Henry Masur, P. Peter Rosen, and Donald Armstrong. Pulmonary disease caused by candida species. *The American Journal of Medicine*, 63 :914–925, 12 1977.
- [188] Anshu B Mathur, Amy M Collinsworth, William M Reichert, William E Kraus, and George A Truskey. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *Journal of biomechanics*, 34(12) :1545–1553, 2001.
- [189] AL Mavor, S Thewes, and B Hube. Systemic fungal infections caused by candida species : epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current drug targets*, 6(8) :863–874, 2005.

- [190] Andrew D McCall, Ruvini U Pathirana, Aditi Prabhakar, Paul J Cullen, and Mira Edgerton. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *NPJ biofilms and microbiomes*, 5(1) :1–12, 2019.
- [191] Andrew D McCall, Ruvini U Pathirana, Aditi Prabhakar, Paul J Cullen, and Mira Edgerton. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *NPJ biofilms and microbiomes*, 5(1) :1–12, 2019.
- [192] Fiona McCartney, John P Gleeson, and David J Brayden. Safety concerns over the use of intestinal permeation enhancers : A mini-review. *Tissue barriers*, 4(2) :e1176822, 2016.
- [193] CGJ McKenzie, U Koser, LE Lewis, JM Bain, HM Mora-Montes, RN Barker, NAR Gow, and LP Erwig. Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infection and immunity*, 78(4) :1650–1658, 2010.
- [194] Daniel Merenstein, Haihong Hu, Cuiwei Wang, Pilar Hamilton, Mandy Blackmon, Hui Chen, Richard Calderone, and Dongmei Li. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in hiv-infected and noninfected women. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 29 :30, 1 2013.
- [195] Melissa B Miller. a bonnie l. bassler. *Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review of Microbiology*, 55(1) :165–199, 2001.
- [196] Nicolas Minc, Arezki Boudaoud, and Fred Chang. Mechanical forces of fission yeast growth. *Current Biology*, 19(13) :1096–1101, 2009.
- [197] Ranjan Mishra, Nicolas Minc, and Matthias Peter. Cells under pressure : how yeast cells respond to mechanical forces. *Trends in Microbiology*, 30(5) :495–510, 2022.
- [198] Ranjan Mishra, Frank van Drogen, Reinhard Dechant, Soojung Oh, Noo Li Jeon, Sung Sik Lee, and Matthias Peter. Protein kinase c and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51) :13471–13476, 2017.
- [199] Takuya Miwa, Yukinobu Takagi, Makiko Shinozaki, Cheol-Won Yun, Wiley A Schell, John R Perfect, Hidehiko Kumagai, and Hisanori Tamaki. Gpr1, a putative g-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 3(4) :919–931, 2004.
- [200] Nicholas P Money. Turgor pressure and the mechanics of fungal penetration. *Canadian journal of botany*, 73(S1) :96–102, 1995.
- [201] Daniel Montelongo-Jauregui, Anand Srinivasan, Anand K Ramasubramanian, and Jose L Lopez-Ribot. An in vitro model for oral mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus gordonii* in synthetic saliva. *Frontiers in microbiology*, 7 :686, 2016.
- [202] Joachim Morschhäuser. Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Medical microbiology and immunology*, 199(3) :165–172, 2010.
- [203] Daniel D Mosel, Raluca Dumitru, Jacob M Hornby, Audrey L Atkin, and Kenneth W Nickerson. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Applied and environmental microbiology*, 71(8) :4938–4940, 2005.
- [204] Thierry Mourer, Mennat El Ghalid, Christophe d’Enfert, and Sophie Bachellier-Bassi. Involvement of amyloid proteins in the formation of biofilms in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Research in Microbiology*, 172(3) :103813, 2021.

- [205] David L Moyes, Manohursingh Runglall, Celia Murciano, Chengguo Shen, Deepa Nayar, Selvam Thavaraj, Arinder Kohli, Ayesha Islam, Hector Mora-Montes, Stephen J Challacombe, et al. A biphasic innate immune mapk response discriminates between the yeast and hyphal forms of candida albicans in epithelial cells. *Cell host & microbe*, 8(3) :225–235, 2010.
- [206] David L Moyes, Duncan Wilson, Jonathan P Richardson, Selene Mogavero, Shirley X Tang, Julia Wernecke, Sarah Höfs, Remi L Gratacap, Jon Robbins, Manohursingh Runglall, et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, 532(7597) :64–68, 2016.
- [207] Liliane Mukaremera, Keunsook K. Lee, Hector M. Mora-Montes, and Neil A.R. Gow. Candida albicans yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. *Frontiers in Immunology*, 8, 6 2017.
- [208] A Munir A Murad, Ping Leng, Melissa Straffon, Jill Wishart, Susan Macaskill, Donna MacCallum, Norbert Schnell, Driss Talibi, Daniel Marechal, Fredj Tekaia, et al. Nrg1 represses yeast–hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in candida albicans. *The EMBO journal*, 20(17) :4742–4752, 2001.
- [209] Masayoshi Muramatsu, Chikara Ohto, Shusei Obata, Eiji Sakuradani, and Sakayu Shimizu. Alkaline ph enhances farnesol production by saccharomyces cerevisiae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 108(1) :52–55, 2009.
- [210] Andrea K. Nash, Thomas A. Auchtung, Matthew C. Wong, Daniel P. Smith, Jonathan R. Gessell, Matthew C. Ross, Christopher J. Stewart, Ginger A. Metcalf, Donna M. Muzny, Richard A. Gibbs, Nadim J. Ajami, and Joseph F. Petrosino. The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. *Microbiome*, 5 :153, 11 2017.
- [211] E. E. Navarro, J. S. Almario, C. King, J. Bacher, P. A. Pizzo, and T. J. Walsh. Detection of candida casts in experimental renal candidiasis : implications for the diagnosis and pathogenesis of upper urinary tract infection. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 32 :415–426, 1994.
- [212] Ramakanth Neeli-Venkata, Celia Municio Diaz, Ruben Celador, Yolanda Sanchez, and Nicolas Minc. Detection of surface forces by the cell-wall mechanosensor wsc1 in yeast. *Developmental Cell*, 56(20) :2856–2870, 2021.
- [213] B. Anne Neville, Christophe d’Enfert, and Marie Elisabeth Bounoux. Candida albicans commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Research*, 15 :81, 11 2015.
- [214] Kee Peng Ng, Chee Sian Kuan, Harvinder Kaur, Shiang Ling Na, Nadia Atiya, and Rukmani Devi Velayuthan. Candida species epidemiology 2000–2013 : a laboratory-based report. *Tropical Medicine & International Health*, 20(11) :1447–1453, 2015.
- [215] Kenneth W Nickerson, Audrey L Atkin, and Jacob M Hornby. Quorum sensing in dimorphic fungi : farnesol and beyond. *Applied and environmental microbiology*, 72(6) :3805–3813, 2006.
- [216] Suzanne M. Noble, Sarah French, Lisa A. Kohn, Victoria Chen, and Alexander D. Johnson. Systematic screens of a candida albicans homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nature Genetics*, 42 :590–598, 7 2010.
- [217] Mairi C Noverr and Gary B Huffnagle. Regulation of candida albicans morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infection and immunity*, 72(11) :6206–6210, 2004.

- [218] Ayala Ofir, Kay Hofmann, Esther Weindling, Tsvia Gildor, Katherine S Barker, P David Rogers, and Daniel Kornitzer. Role of a candida albicans nrm1/whi5 homologue in cell cycle gene expression and dna replication stress response. *Molecular microbiology*, 84(4) :778–794, 2012.
- [219] Heinz D Osiewacz. Hyphal tip growth outstanding questions. In *Molecular Biology of Fungal Development*, pages 38–65. CRC Press, 2002.
- [220] Kalyan Pande, Changbin Chen, and Suzanne M Noble. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes candida albicans commensalism. *Nature genetics*, 45(9) :1088–1091, 2013.
- [221] Theodoros G Papaioannou and Christodoulos Stefanadis. Vascular wall shear stress : basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol*, 46(1) :9–15, 2005.
- [222] Peter G. Pappas. Invasive candidiasis. *Infectious disease clinics of North America*, 20 :485–506, 9 2006.
- [223] Joseph C. Parker, John J. McCloskey, and Richard S. Lee. Human cerebral candidosis — a postmortem evaluation of 19 patients. *Human Pathology*, 12 :23–28, 1 1981.
- [224] Miranda J Patterson, Christopher G McKenzie, Deborah A Smith, Alessandra da Silva Dantas, Sam Sherston, Elizabeth A Veal, Brian A Morgan, Donna M MacCallum, Lars-Peter Erwig, and Janet Quinn. Ybp1 and gpx3 signaling in candida albicans govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the cap1 transcription factor and macrophage escape. *Antioxidants & redox signaling*, 19(18) :2244–2260, 2013.
- [225] Michael L Pendrak and David D Roberts. Hbr1 activates and represses hyphal growth in candida albicans and regulates fungal morphogenesis under embedded conditions. *PLoS One*, 10(6) :e0126919, 2015.
- [226] M. A. Pfaller and D. J. Diekema. Epidemiology of invasive candidiasis : a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, 20 :133–163, 1 2007.
- [227] MA Pfaller, DJ Diekema, MG Rinaldi, R Barnes, B Hu, AV Veselov, N Tiraboschi, E Nagy, and DL Gibbs. Global antifungal surveillance group : Results from the artemis disk global antifungal surveillance study : a 6.5-year analysis of susceptibilities of candida and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*, 43 :5848–5859, 2005.
- [228] Quynh T Phan, Carter L Myers, Yue Fu, Donald C Sheppard, Michael R Yeaman, William H Welch, Ashraf S Ibrahim, John E Edwards Jr, and Scott G Filler. Als3 is a candida albicans invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS biology*, 5(3) :e64, 2007.
- [229] Jessica V Pierce and Carol A Kumamoto. Variation in candida albicans efg1 expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. *MBio*, 3(4) :e00117–12, 2012.
- [230] Vítězslav Plocek, Libuše Váchová, Vratislav Šťovíček, and Zdena Palková. Cell distribution within yeast colonies and colony biofilms : how structure develops. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11) :3873, 2020.
- [231] Melanie Polke, Ines Leonhardt, Oliver Kurzai, and Ilse D Jacobsen. Farnesol signalling in candida albicans—more than just communication. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(2) :230–243, 2018.

- [232] Melanie Polke, Marcel Sprenger, Kirstin Scherlach, María Cristina Albán-Proañó, Ronny Martin, Christian Hertweck, Bernhard Hube, and Ilse D. Jacobsen. A functional link between hyphal maintenance and quorum sensing in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 103 :595–617, 2017.
- [233] David Pruyne and Anthony Bretscher. Polarization of cell growth in yeast. establishment and maintenance of polarity states. *Journal of cell science*, 113(3) :365–375, 2000.
- [234] Charles Puerner, Nino Kukhaleishvili, Darren Thomson, Sebastien Schaub, Xavier Noblin, Agnese Seminara, Martine Bassilana, and Robert A Arkowitz. Mechanical force-induced morphology changes in a human fungal pathogen. *BMC biology*, 18(1) :1–21, 2020.
- [235] Laxmi Shanker Rai, Lasse Van Wijlick, Marie-Elisabeth Bougnoux, Sophie Bachellier-Bassi, and Christophe d'Enfert. Regulators of commensal and pathogenic life-styles of an opportunistic fungus—*Candida albicans*. *Yeast*, 38(4) :243–250, 2021.
- [236] Gordon Ramage, Stefano Bachmann, Thomas F Patterson, Brian L Wickes, and José L López-Ribot. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6) :973–980, 2002.
- [237] Gordon Ramage, Stephen P Saville, Brian L Wickes, and José L López-Ribot. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology*, 68(11) :5459–5463, 2002.
- [238] Riina Rautemaa and Gordon Ramage. Oral candidosis—clinical challenges of a biofilm disease. *Critical reviews in microbiology*, 37(4) :328–336, 2011.
- [239] Nicola C Reading and Vanessa Sperandio. Quorum sensing : the many languages of bacteria. *FEMS microbiology letters*, 254(1) :1–11, 2006.
- [240] Austin Ricker, Margaret Vickerman, and Anna Dongari-Bagtzoglou. Streptococcus gordonii glucosyltransferase promotes biofilm interactions with *Candida albicans*. *Journal of oral microbiology*, 6(1) :23419, 2014.
- [241] Natsuko Rivera-Yoshida, Juan A Arias Del Angel, and Mariana Benítez. Microbial multicellular development : mechanical forces in action. *Current opinion in genetics & development*, 51 :37–45, 2018.
- [242] Elvira Román, Fabien Cottier, Joachim F Ernst, and Jesús Pla. Msb2 signaling mucin controls activation of cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 8(8) :1235–1249, 2009.
- [243] Lorena Romero-Santacreu, Joaquín Moreno, José E Pérez-Ortín, and Paula Alepuz. Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*, 15(6) :1110–1120, 2009.
- [244] R. R. Roth and W. D. James. Microbial ecology of the skin. *Annual Review of Microbiology*, 42 :441–464, 1988.
- [245] Darpan Saraswat, Rohitashw Kumar, Tanaya Pande, Mira Edgerton, and Paul J Cullen. Signalling mucin msb2 regulates adaptation to thermal stress in *Candida albicans*. *Molecular microbiology*, 100(3) :425–441, 2016.
- [246] Stephen P. Saville, Anna L. Lazzell, Alexander P. Bryant, Angelika Fretzen, Alex Monreal, Erik O. Solberg, Carlos Monteagudo, Jose L. Lopez-Ribot, and G. Todd Milne. Inhibition of filamentation can be used to treat disseminated candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 :3312–3316, 10 2006.

- [247] Stephen P Saville, Anna L Lazzell, Carlos Monteagudo, and Jose L Lopez-Ribot. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of candida albicans during infection. *Eukaryotic cell*, 2(5) :1053–1060, 2003.
- [248] Ivo F Sbalzarini and Petros Koumoutsakos. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *Journal of structural biology*, 151(2) :182–195, 2005.
- [249] Martin Schaller, Claudia Borelli, Hans C Korting, and Bernhard Hube. Hydrolytic enzymes as virulence factors of candida albicans. *Mycoses*, 48(6) :365–377, 2005.
- [250] Kurt M Schmoller, JJ Turner, M Kõivomägi, and Jan M Skotheim. Dilution of the cell cycle inhibitor whi5 controls budding-yeast cell size. *Nature*, 526(7572) :268–272, 2015.
- [251] Sarra Sebaa, Zahia Boucherit-Otmani, and Philippe Courtois. Effects of tyrosol and farnesol on candida albicans biofilm. *Molecular medicine reports*, 19(4) :3201–3209, 2019.
- [252] Sidi Mohammed Lahbib Seddiki, Zahia Boucherit-Otmani, Kebir Boucherit, Souad Bads-Amir, Mourad Taleb, and Dennis Kunkel. Assessment of the types of catheter infectivity caused by candida species and their biofilm formation. first study in an intensive care unit in algeria. *International journal of general medicine*, 6 :1, 2013.
- [253] Bastian Seelbinder, Jiarui Chen, Sascha Brunke, Ruben Vazquez-Urbe, Rakesh Santhaman, Anne-Christin Meyer, Felipe Senne de Oliveira Lino, Ka-Fai Chan, Daniel Loos, Lejla Imamovic, et al. Antibiotics create a shift from mutualism to competition in human gut communities with a longer-lasting impact on fungi than bacteria. *Microbiome*, 8(1) :1–20, 2020.
- [254] Brittany G Seman, Jessica L Moore, Allison K Scherer, Bailey A Blair, Sony Manandhar, Joshua M Jones, and Robert T Wheeler. Yeast and filaments have specialized, independent activities in a zebrafish model of candida albicans infection. *Infection and immunity*, 86(10) :e00415–18, 2018.
- [255] Camile P Semighini, Jacob M Hornby, Raluca Dumitru, Kenneth W Nickerson, and Steven D Harris. Farnesol-induced apoptosis in aspergillus nidulans reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Molecular microbiology*, 59(3) :753–764, 2006.
- [256] Diego O Serra, Gisela Klauck, and Regine Hengge. Vertical stratification of matrix production is essential for physical integrity and architecture of macrocolony biofilms of e scherichia coli. *Environmental microbiology*, 17(12) :5073–5088, 2015.
- [257] Eleonora R Setiadi, Thomas Doedt, Fabien Cottier, Christine Noffz, and Joachim F Ernst. Transcriptional response of candida albicans to hypoxia : linkage of oxygen sensing and efg1p-regulatory networks. *Journal of molecular biology*, 361(3) :399–411, 2006.
- [258] Rebecca S Shapiro, Priya Uppuluri, Aimee K Zaas, Cathy Collins, Heather Senn, John R Perfect, Joseph Heitman, and Leah E Cowen. Hsp90 orchestrates temperature-dependent candida albicans morphogenesis via ras1-pka signaling. *Current Biology*, 19(8) :621–629, 2009.
- [259] Roman Shchepin, Jacob M. Hornby, Erin Burger, Timothy Niessen, Patrick Dussault, and Kenneth W. Nickerson. Quorum sensing in candida albicans : Probing farnesol’s mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chemistry & Biology*, 10 :743–750, 8 2003.
- [260] Junqing Shen, Leah E Cowen, April M Griffin, Leon Chan, and Julia R Köhler. The candida albicans pescadillo homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52) :20918–20923, 2008.

- [261] Sarah L Sherrington, Eleanor Sorsby, Nabeel Mahtey, Pizga Kumwenda, Megan D Lenardon, Ian Brown, Elizabeth R Ballou, Donna M MacCallum, and Rebecca A Hall. Adaptation of candida albicans to environmental ph induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *PLoS pathogens*, 13(5) :e1006403, 2017.
- [262] Giovanna Simonetti, Claudio Passariello, Dante Rotili, Antonello Mai, Enrico Garaci, and Anna Teresa Palamara. Histone deacetylase inhibitors may reduce pathogenicity and virulence in candida albicans. *FEMS yeast research*, 7(8) :1371–1380, 2007.
- [263] Amy K. Slenker, Scott W. Keith, and David L. Horn. Two hundred and eleven cases of candida osteomyelitis : 17 case reports and a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 73 :89–93, 5 2012.
- [264] Deborah A Smith, Susan Nicholls, Brian A Morgan, Alistair JP Brown, and Janet Quinn. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen candida albicans. *Molecular biology of the cell*, 15(9) :4179–4190, 2004.
- [265] David R Soll and Karla J Daniels. Plasticity of candida albicans biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3) :565–595, 2016.
- [266] David R Soll, Michael A Herman, and Margaret A Staebell. The involvement of cell wall expansion in the two modes of mycelium formation of candida albicans. *Microbiology*, 131(09) :2367–2375, 1985.
- [267] Peter Staib and Joachim Morschhäuser. Chlamydospore formation in candida albicans and candida dubliniensis—an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50(1) :1–12, 2007.
- [268] M Staniszewska, M Bondaryk, E Swoboda-Kopec, K Siennicka, G Sygitowicz, and W Kurzatowski. Candida albicans morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 :813–821, 2013.
- [269] Daniel C Stewart, Dalton Berrie, Jian Li, Xinyue Liu, Cooper Rickerson, David Mkoji, Atif Iqbal, Sanda Tan, Andria L Doty, Sarah C Glover, et al. Quantitative assessment of intestinal stiffness and associations with fibrosis in human inflammatory bowel disease. *PloS one*, 13(7) :e0200377, 2018.
- [270] Karin Strijbis, Fikadu G Tafesse, Gregory D Fairn, Martin D Witte, Stephanie K Dougan, Nicki Watson, Eric Spooner, Alexandre Esteban, Valmik K Vyas, Gerald R Fink, et al. Bruton's tyrosine kinase (btk) and vav1 contribute to dectin1-dependent phagocytosis of candida albicans in macrophages. *PLoS pathogens*, 9(6) :e1003446, 2013.
- [271] Chang Su, Yang Lu, and Haoping Liu. Reduced tor signaling sustains hyphal development in candida albicans by lowering hog1 basal activity. *Molecular biology of the cell*, 24(3) :385–397, 2013.
- [272] Peter Sudbery, Neil Gow, and Judith Berman. The distinct morphogenic states of candida albicans. *Trends in microbiology*, 12(7) :317–324, 2004.
- [273] Masato Tashiro, Soichiro Kimura, Kazuhiro Tateda, Tomoo Saga, Akira Ohno, Yoshikazu Ishii, Koichi Izumikawa, Takayoshi Tashiro, Shigeru Kohno, and Keizo Yamaguchi. Pravastatin inhibits farnesol production in candida albicans and improves survival in a mouse model of systemic candidiasis. *Medical Mycology*, 50 :353–360, 5 2012.
- [274] Darren D Thomson, Silvia Wehmeier, FitzRoy J Byfield, Paul A Janmey, David Caballero-Lima, Alison Crossley, and Alexandra C Brand. Contact-induced apical asymmetry drives the thigmotropic responses of candida albicans hyphae. *Cellular microbiology*, 17(3) :342–354, 2015.

- [275] MARIE-BÉATRICE TRIBOULOT, Jeremy Pritchard, and Deri Tomos. Stimulation and inhibition of pine root growth by osmotic stress. *New Phytologist*, 130(2) :169–175, 1995.
- [276] Carolina Tropini, Eli Lin Moss, Bryan Douglas Merrill, Katharine Michelle Ng, Steven Kyle Higginbottom, Ellen Pun Casavant, Carlos Gutierrez Gonzalez, Brayon Fremin, Donna Michelle Bouley, Joshua Eric Elias, et al. Transient osmotic perturbation causes long-term alteration to the gut microbiota. *Cell*, 173(7) :1742–1754, 2018.
- [277] Jonathan J Turner, Jennifer C Ewald, and Jan M Skotheim. Cell size control in yeast. *Current biology*, 22(9) :R350–R359, 2012.
- [278] Ohimai Unoje, Mengli Yang, Yang Lu, Chang Su, and Haoping Liu. Linking sfl1 regulation of hyphal development to stress response kinases in candida albicans. *mSphere*, 5, 1 2020.
- [279] Priya Uppuluri, Christopher G. Pierce, Derek P. Thomas, Sarah S. Bubeck, Stephen P. Saville, and Jose L. Lopez-Ribot. The transcriptional regulator nrg1p controls candida albicans biofilm formation and dispersion. *Eukaryotic Cell*, 9 :1531–1537, 10 2010.
- [280] Nadia Vadaie, Heather Dionne, Darowan S Akajagbor, Seth R Nickerson, Damian J Krysan, and Paul J Cullen. Cleavage of the signaling mucin msb2 by the aspartyl protease yps1 is required for mapk activation in yeast. *The Journal of cell biology*, 181(7) :1073–1081, 2008.
- [281] Alberto Valencia, Claude LeMen, Christophe Ellero, Christine Lafforgue-Baldas, Jeffrey F Morris, and Philippe Schmitz. Direct observation of the microfiltration of yeast cells at the micro-scale : Characterization of cake properties. *Separation and Purification Technology*, 298 :121614, 2022.
- [282] Beatriz Vallejo, Emilien Peltier, Victor Garrigós, Emilia Matallana, Philippe Marullo, and Agustín Aranda. Role of saccharomyces cerevisiae nutrient signaling pathways during winemaking : a phenomics approach. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8 :853, 2020.
- [283] Verónica Veses and Neil A.R. Gow. Vacuolar dynamics during the morphogenetic transition in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 8 :1339–1348, 12 2008.
- [284] Verónica Veses and Neil A R Gow. Pseudohypha budding patterns of candida albicans. *Medical mycology*, 47 :268–75, 5 2009.
- [285] Ramiro Vilchez, André Lemme, Britta Ballhausen, Verena Thiel, Stefan Schulz, Rolf Jansen, Helena Sztajer, and Irene Wagner-Döbler. Streptococcus mutans inhibits candida albicans hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (sdsf). *Chem-biochem*, 11(11) :1552–1562, 2010.
- [286] Sonia Villa, Mohammad Hamideh, Anthony Weinstock, Mohammad N Qasim, Tony R Hazbun, Adnane Sellam, Aaron D Hernday, and Shankar Thangamani. Transcriptional control of hyphal morphogenesis in candida albicans. *FEMS yeast research*, 20(1) :foaa005, 2020.
- [287] CC Villar, H Kashleva, CJ Nobile, AP Mitchell, and A Dongari-Bagtzoglou. Mucosal tissue invasion by candida albicans is associated with e-cadherin degradation, mediated by transcription factor rim101p and protease sap5p. *Infection and immunity*, 75(5) :2126–2135, 2007.
- [288] Jean Louis Vincent, Jordi Rello, John Marshall, Eliezer Silva, Antonio Anzueto, Claude D. Martin, Rui Moreno, Jeffrey Lipman, Charles Gomersall, Yasser Sakr, and Konrad Reinhart. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 302 :2323–2329, 12 2009.

- [289] Aleksandra Virag and Steven D Harris. The spitzenkörper : a molecular perspective. *Mycological research*, 110(1) :4–13, 2006.
- [290] Aleksandra Virag and Steven D. Harris. The spitzenkörper : a molecular perspective. *Mycological Research*, 110 :4–13, 1 2006.
- [291] Daan Vorselen, Sarah R Barger, Yifan Wang, Wei Cai, Julie A Theriot, Nils C Gauthier, and Mira Krendel. Phagocytic ‘teeth’ and myosin-ii ‘jaw’ power target constriction during phagocytosis. *Elife*, 10 :e68627, 2021.
- [292] Daan Vorselen, Yifan Wang, Miguel M de Jesus, Pavak K Shah, Matthew J Footer, Morgan Huse, Wei Cai, and Julie A Theriot. Microparticle traction force microscopy reveals subcellular force exertion patterns in immune cell–target interactions. *Nature communications*, 11(1) :1–14, 2020.
- [293] Chrysovalantis Voutouri and Triantafyllos Stylianopoulos. Accumulation of mechanical forces in tumors is related to hyaluronan content and tissue stiffness. *PloS one*, 13(3) :e0193801, 2018.
- [294] Slavena Vylkova and Michael C Lorenz. Modulation of phagosomal ph by candida albicans promotes hyphal morphogenesis and requires stp2p, a regulator of amino acid transport. *PLoS pathogens*, 10(3) :e1003995, 2014.
- [295] Lian-Hui Wang, Yawen He, Yunfeng Gao, Ji En Wu, Yi-Hu Dong, Chaozu He, Su Xing Wang, Li-Xing Weng, Jin-Ling Xu, Leng Tay, et al. A bacterial cell–cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular microbiology*, 51(3) :903–912, 2004.
- [296] Yulei Wang, Chih Long Liu, John D Storey, Robert J Tibshirani, Daniel Herschlag, and Patrick O Brown. Precision and functional specificity in mrna decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9) :5860–5865, 2002.
- [297] Anja Wartenberg, Jörg Linde, Ronny Martin, Maria Schreiner, Fabian Horn, Ilse D Jacobsen, Sabrina Jenull, Thomas Wolf, Karl Kuchler, Reinhard Guthke, et al. Microevolution of candida albicans in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant. *PLoS genetics*, 10(12) :e1004824, 2014.
- [298] Allon Weiner, François Orange, Sandra Lacas-Gervais, Katya Rechav, Vikram Ghugtyal, Martine Bassilana, and Robert A Arkowitz. On-site secretory vesicle delivery drives filamentous growth in the fungal pathogen candida albicans. *Cellular Microbiology*, 21(1) :e12963, 2019.
- [299] Allon Weiner, François Orange, Sandra Lacas-Gervais, Katya Rechav, Vikram Ghugtyal, Martine Bassilana, and Robert A. Arkowitz. On-site secretory vesicle delivery drives filamentous growth in the fungal pathogen candida albicans. *Cellular Microbiology*, 21 :e12963, 1 2019.
- [300] Ziva Weissman and Daniel Kornitzer. A family of candida cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Molecular microbiology*, 53(4) :1209–1220, 2004.
- [301] Sarah Jane White, Ari Rosenbach, Paul Lephart, Diem Nguyen, Alana Benjamin, Saul Tzipori, Malcolm Whiteway, Joan Meccas, and Carol A. Kumamoto. Self-regulation of candida albicans population size during gi colonization. *PLOS Pathogens*, 3 :e184, 12 2007.
- [302] Sarah Jane White, Ari Rosenbach, Paul Lephart, Diem Nguyen, Alana Benjamin, Saul Tzipori, Malcolm Whiteway, Joan Meccas, and Carol A Kumamoto. Self-regulation of candida albicans population size during gi colonization. *PLoS pathogens*, 3(12) :e184, 2007.

- [303] Malcolm Whiteway and Catherine Bachewich. Morphogenesis in candida albicans. *Annual review of microbiology*, 61 :529, 2007.
- [304] DW Williams, KL Bartie, AJC Potts, MJ Wilson, MJ Fardy, and MAO Lewis. Strain persistence of invasive candida albicans in chronic hyperplastic candidosis that underwent malignant change. *Gerodontology*, 18 :73–78, 12 2001.
- [305] Duncan Wilson, Julian R Naglik, and Bernhard Hube. The missing link between candida albicans hyphal morphogenesis and host cell damage. *PLoS pathogens*, 12(10) :e1005867, 2016.
- [306] Hilmar Wisplinghoff, Tammy Bischoff, Sandra M Tallent, Harald Seifert, Richard P Wenzel, and Michael B Edmond. Nosocomial bloodstream infections in us hospitals : analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical infectious diseases*, 39(3) :309–317, 2004.
- [307] Tom D Wolkow, Steven D Harris, and John E Hamer. Cytokinesis in aspergillus nidulans is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. *Journal of cell science*, 109(8) :2179–2188, 1996.
- [308] Graham D Wright, Jochen Arlt, Wilson CK Poon, and Nick D Read. Optical tweezer micro-manipulation of filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 44(1) :1–13, 2007.
- [309] Xueqing Wu, Sisi Zhang, Haiying Li, Laien Shen, Chenle Dong, Yao Sun, Huale Chen, Boyun Xu, Wenyi Zhuang, Margaret Deighton, et al. Biofilm formation of candida albicans facilitates fungal infiltration and persister cell formation in vaginal candidiasis. *Frontiers in microbiology*, 11 :1117, 2020.
- [310] Jing Xie, Li Tao, Clarissa J Nobile, Yaojun Tong, Guobo Guan, Yuan Sun, Chengjun Cao, Aaron D Hernday, Alexander D Johnson, Lixin Zhang, et al. White-opaque switching in natural mtl a/ $\alpha$  isolates of candida albicans : evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. *PLoS biology*, 11(3) :e1001525, 2013.
- [311] Ying Xie, Jialin Sun, Xiao Han, Alma Turšič-Wunder, Joel DW Toh, Wanjin Hong, Yong-Gui Gao, and Yansong Miao. Polarisome scaffold spa2-mediated macromolecular condensation of aip5 for actin polymerization. *Nature communications*, 10(1) :1–18, 2019.
- [312] Zhihong Xie, Angela Thompson, Takanori Sobue, Helena Kashleva, Hongbin Xu, John Vasila-kos, and Anna Dongari-Bagtzoglou. Candida albicans biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. *The Journal of infectious diseases*, 206(12) :1936–1945, 2012.
- [313] Xiao-Li Xu, Raymond Teck Ho Lee, Hao-Ming Fang, Yan-Ming Wang, Rong Li, Hao Zou, Yong Zhu, and Yue Wang. Bacterial peptidoglycan triggers candida albicans hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase cyr1p. *Cell host & microbe*, 4(1) :28–39, 2008.
- [314] Deborah L.R. Yamamura, Coleman Rotstein, Lindsay E. Nicolle, Stratis Ioannou, Lynn Johnston, Walter Schlech, G. William Thompson, Claire Beliveau, Marie Gourdeau, Claude Anne Tremblay, Anne Marie Bourgault, Gregoire Noel, Guy St. Germain, Gary Garber, Gerald Evans, John Conly, Sigmund Krajden, Sharon Walmsley, Elaine Wang, Coleman Rotstein, Daniel Gregson, Lindsay Nicolle, Kurt Williams, Thomas Louie, and Peter Phillips. Candidemia at selected canadian sites : results from the fungal disease registry, 1992-1994. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, 160 :493, 2 1999.

- 
- [315] Teresa Zelante, Rossana G. Iannitti, Cristina Cunha, Antonella DeLuca, Gloria Giovannini, Giuseppe Pieraccini, Riccardo Zecchi, Carmen D'Angelo, Cristina Massi-Benedetti, Francesca Fallarino, Agostinho Carvalho, Paolo Puccetti, and Luigina Romani. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 39 :372–385, 8 2013.
- [316] Li Zhang, Wenqiang Chang, Bin Sun, Matthias Groh, Andreas Speicher, and Hongxiang Lou. Bisbibenzyls, a new type of antifungal agent, inhibit morphogenesis switch and biofilm formation through upregulation of dpp3 in candida albicans. *PloS one*, 6(12) :e28953, 2011.
- [317] Xiaomin Zhao, Claude Pujol, David R Soll, and Lois L Hoyer. Allelic variation in the contiguous loci encoding candida albicansals5, als1 and als9. *Microbiology*, 149(10) :2947–2960, 2003.
- [318] Xinde Zheng, Yanming Wang, and Yue Wang. Hgc1, a novel hypha-specific g1 cyclin-related protein regulates candida albicans hyphal morphogenesis. *The EMBO journal*, 23(8) :1845–1856, 2004.
- [319] Xinde Zheng, Yanming Wang, and Yue Wang. Hgc1, a novel hypha-specific g1 cyclin-related protein regulates candida albicans hyphal morphogenesis. *The EMBO journal*, 23(8) :1845–1856, 2004.
- [320] Xin-Liang Zhou, Mary Ann Stumpf, Harvey C Hoch, and Ching Kung. A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus uromyces. *Science*, 253(5026) :1415–1417, 1991.
- [321] Naomi Ziv, Lucas R Brenes, and Alexander Johnson. Multiple molecular events underlie stochastic switching between 2 heritable cell states in fungi. *PLoS Biology*, 20(5) :e3001657, 2022.
- [322] Paola C Zucchi, Talya R Davis, and Carol A Kumamoto. A candida albicans cell wall-linked protein promotes invasive filamentation into semi-solid medium. *Molecular microbiology*, 76(3) :733–748, 2010.
- [323] Magorzata Zwoliska-Wciso, Alicja Budak, Jozef Bogda, Danuta Trojanowska, and Jerzy Stachura. Fungal colonization of gastric mucosa and its clinical relevance. *Med Sci Monit*, 7(5) :982–988, 2001.



La levure filamenteuse *Candida albicans* est un membre bénin du microbiote chez l'humain en bonne santé. Cependant, cet organisme peut devenir un pathogène opportuniste, particulièrement chez les patients immunodéprimés. La plasticité morphologique de *C. albicans* est un facteur majeur de sa virulence. Les hyphes, de longs filaments multicellulaires et invasifs, et les levures unicellulaires de forme ovoïde, supportent respectivement l'invasion et la dissémination dans les tissus et le système sanguin. La transition de phénotype réversible levure-vers-hyphe dépend de multiples paramètres physico-chimiques de l'environnement de *Candida*, notamment le pH, la température et des facteurs de croissance. *C. albicans* sécrète également du farnésol, une molécule de *quorum-sensing* qui est impliquée dans l'inhibition de l'induction hyphale.

Contrairement à l'impact des paramètres chimiques, la manière dont les forces mécaniques peuvent affecter le phénotype adopté reste peu renseignée. Nous avons utilisé des dispositifs microfluidiques permettant l'imagerie de cellules vivantes et des expériences à haut débit afin de quantifier l'impact de contraintes compressives sur la transition levure-hyphe. Le principe de ce dispositif repose sur l'émergence de la pression induite par la croissance des cellules sous confinement spatial.

En utilisant ces dispositifs, nous avons observé l'expression d'un gène spécifique à la croissance hyphale (*HWP1*) sous de faibles intensités de forces compressives. La probabilité d'induction levure-hyphe dans la population confinée semble modulée par la concentration de farnésol sécrété, et par le taux de division sous pression. Pour décrire l'accumulation locale de farnésol dans la population dense, nous proposons un modèle théorique d'advection-diffusion 1D en milieu poreux reposant notamment sur l'approximation de Kozeny-Carman. Les résultats obtenus suggèrent une sous-estimation importante de la résistance hydrodynamique du poreux. Cette limitation ouvre de nouvelles questions sur le transport dans un poreux constitué de levures déformables et en croissance. Le modèle prédit la dynamique temporelle lorsque l'advection est efficace. Nos résultats suggèrent qu'en dehors de toute inhibition, l'efficacité d'induction par la pression est aussi forte qu'un stress inductif connu tel que l'addition de sérum à 37°C.

La caractérisation de l'expression du gène *HWP1* en *cellule-unique* suggère que la dynamique d'induction est régulée et compense la limitation biophysique de la pression. En parallèle, la maintenance du programme épigénétique hyphal semble limitée sous plus forte pression (centaine de kPa) via un ralentissement de la croissance. En revanche, la croissance hyphale est maintenue lorsque les hyphes accèdent à un second compartiment permettant la relaxation mécanique. Ensemble, les résultats de cette thèse suggèrent que la pression induite par la croissance confinée favorise le changement de phénotype chez *C. albicans*, et que cette transition est stable. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles investigations sur la régulation par la mécanique de cette transition et son lien avec la pathogénicité de *C. albicans*.

## MOTS CLÉS

---

*C. albicans*, levures, biophysique, microfluidique, plasticité phénotypique, contraintes mécaniques, hyphes.

## ABSTRACT

---

The filamentous yeast *Candida albicans* is a benign member of the healthy human microbiota but can also turn into an opportunistic pathogen in immunocompromised patients. The morphological plasticity of *C. albicans* is a major virulence factor. Hyphae i.e. elongated multi-cellular invasive filaments, and unicellular ovaloid yeasts, respectively participate to invasion and dissemination in the tissues and bloodstream. The reversible yeast-to-hypha phenotypic switches depend on the physicochemical properties of *C. albicans* environment, notably pH, temperature and growth factors. *C. albicans* also secretes farnesol, a quorum-sensing molecule that is involved in inhibiting hyphal induction.

In contrast to the impact of chemical parameters, little is known about how mechanical forces affect the growth phenotype. To this end, we have developed dedicated microfluidic devices allowing both live-cell imaging and high-throughput experiments to quantify the impact of compressive stress on the yeast-to-hypha transition. The principle of our devices is based on the emergence of growth-induced pressure when cells proliferate in confined space.

Using these devices, we observed expression of the hyphal-specific gene *HWP1* under small compressive stress intensities. Yeast-to-hypha transition probability in the confined population seems modulated by the concentration of secreted farnesol and cell-division rate under pressure. To describe the local accumulation of farnesol in the dense population, we propose a theoretical model of 1D advection-diffusion in a porous medium, based in particular on the Kozeny-Carman approximation. The results obtained suggest a significant underestimation of the hydrodynamic resistance of the porous material. This limitation opens new questions about the transport in a porous environment, composed of deformable and growing yeasts. The model predicts the temporal dynamics when advection is effective. Our results suggest that, taking inhibition into account, the efficiency of induction by pressure is as strong as a known inductive stress such as the addition of serum at 37°C.

Single-cell characterization of *HWP1* gene expression suggests a regulated mechanism during induction that compensates for biophysical pressure limitation. Single-cell reporter expression also showed that higher compressive stress values (hundreds of kPa) limits hyphal-growth maintenance. In contrast, observation of hyphae in a second uncompressed chamber showed that hyphal epigenetic program is maintained upon mechanical relaxation.

Together, the results of this thesis suggest that growth-induced pressure promotes phenotype change in *C. albicans*, and that this transition is stable. These results pave the way for the investigation of the mechanical regulation of the yeast-to-hypha transition and its link with the pathogenicity of *C. albicans*.

## KEYWORDS

---

*C. albicans*, yeasts, biophysics, microfluidics, phenotypic plasticity, mechanical stresses, hyphae.