



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact des contraintes de croissance sur des micro-tumeurs

Tiphaine Mateo

► **To cite this version:**

Tiphaine Mateo. Etude de l'impact des contraintes de croissance sur des micro-tumeurs. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. UPS Toulouse, 2023. Français. NNT: . tel-04425785

**HAL Id: tel-04425785**

**<https://laas.hal.science/tel-04425785>**

Submitted on 30 Jan 2024

**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

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
**Tiphaine MATEO**

Le 14 décembre 2023

**Etude de l'impact des contraintes de croissance sur des  
micro-tumeurs**

---

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

**LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes**

Thèse dirigée par

**Morgan DELARUE**

Jury

Mme Séverine LE GAC, Rapporteur

M. Fabien MONTEL, Rapporteur

Mme Stéphanie DESCROIX, Examinatrice

Mme Gaëlle RECHER, Examinatrice

Mme Patricia VICENDO, Examinatrice

M. Morgan DELARUE, Directeur de thèse

Mme Julie GUILLERMET-GUIBERT, Invitée

M. Sylvain MONNIER, Invité



# Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mes rapporteurs et membres du jury, pour la qualité des discussions que nous avons eue lors de la soutenance, pour leur bienveillance et leurs différents retours.

Je suis fière d'avoir accompli cette thèse et aussi extrêmement reconnaissante d'avoir pu travailler avec des personnes inspirantes, sur qui j'ai pu compter et qui m'ont fait avancer tant sur le plan scientifique que personnel.

Je dois beaucoup à Morgan Delarue, mon directeur de thèse, qui m'a d'abord permis d'effectuer mon stage au LAAS-CNRS et qui m'a ensuite donné l'opportunité de poursuivre mes travaux en thèse. Morgan, j'ai énormément apprécié de travailler avec toi et je souhaite te remercier pour ton encadrement qui m'a permis d'accomplir de belles choses dans un cadre bienveillant. Nous avons eu des discussions riches, qui ont été très importantes pour développer ma propre réflexion scientifique. J'admire l'énergie que tu consacres à toutes les personnes que tu supervises ! Tu m'as toujours soutenue et cela m'a énormément aidée, notamment pour cette dernière ligne droite. Merci vraiment pour ces années, je pars du labo avec beaucoup de souvenirs de tous ces moments de discussions et de partage !

Au cours de ma thèse, j'ai eu le plaisir d'être impliquée dans diverses collaborations et j'aimerais remercier ces personnes avec lesquelles j'ai pu travailler. Je souhaite commencer par remercier Julie Guillermet-Guibert et son équipe au CRCT (et plus particulièrement Mickaël Di-Luoffo, Silvia Arcucci et Sanzhar Aitbay) avec qui nous avons partagé des discussions sur nos différents projets. Julie, merci vraiment pour le temps que tu as consacré à relire mon manuscrit, merci également pour tes retours lors de ma répétition de soutenance, cela m'a beaucoup aidé pour progresser ! Mickaël, merci d'être venu à l'une de mes répétitions de soutenance et merci également pour ton soutien et tes encouragements !

Je souhaite également remercier Pierre Cordelier et Agathe Redouté, pour nous avoir initié aux expériences sur les virus ainsi que pour les discussions scientifiques autour de ce projet. Merci également pour vos retours à tous les deux sur cette partie de mon manuscrit.

Enfin, j'aimerais également remercier Hélène Delanoë, avec qui nous avons collaboré lors de ma dernière année de thèse sur les simulations du chapitre 3. Merci d'avoir pris le temps de me partager tes commentaires sur cette partie de mon manuscrit !

Ce qui m'a beaucoup plu au LAAS-CNRS, c'est de pouvoir compter sur les différentes personnes qui gèrent les plateformes du laboratoire. Un grand merci à Charline Blatche pour ses formations en biologie, ses conseils et bien sûr pour son incroyable implication sur la plateforme carac'. Merci également à Sandrine Assie-Souleille pour les formations de la plateforme carac' et Julien Roux pour ses formations sur la plateforme de microscopie. Enfin, merci à l'équipe TEAM (et plus particulièrement à Fabien Mesnilgrente, Adrian Laborde, Laurent Mazenq, David Bourrier et Pierre-François Calmon) pour leur aide précieuse en salle blanche. David, merci encore pour toute ton aide sur le développement des tigarettes en verre !

Si je me suis sentie aussi bien durant ces quelques années au laboratoire, c'est aussi grâce à l'équipe MILE. Lorsque j'ai intégré l'équipe, j'ai d'abord rencontré Zacchari Ben Meriem, qui m'a supervisé et qui m'a fait découvrir la vie au labo (« ou la vie tout court ! » non Zack il ne faut pas exagérer ! haha). Merci pour ta pédagogie, tes mises en scène théâtrales, tes goûts éclectiques en matière de musique qui vont de la trance à la cucaracha. Je souhaite également remercier Inga Tijunelyte et Marianne Elias, avec qui j'ai partagé de très bons moments lorsque j'ai rejoint le bureau A10. Puis vous êtes partis, les uns après les autres, laissant un grand vide mais aussi la place à d'autres rencontres. C'est ainsi que Sylvain Landiech, aka « Le S », a débarqué dans notre bureau ! Un homme qui donne l'illusion d'être couché lorsqu'il est assis, qui pratique l'art du lancer d'objets non identifiés mieux que personne et qui est toujours partant pour motiver les troupes à sortir... Merci à toi pour tous ces moments ! Puis, Céline Denais et Julien Faccini ont eux aussi intégré notre bureau. Merci à vous deux pour tous votre temps et votre patience pour répondre à mes questions bio ! Céline, merci également à toi pour tous ces petits moments où on a pu refaire le monde à deux, bien souvent autour d'un thé/café et parfois (toujours) avec quelques biscuits. Julien, merci pour ton humour ! Je garde en mémoire tes imitations qui m'ont fait beaucoup rire. J'en profite également pour placer un petit big up à ton fils Elio, qui est tout simplement incroyable haha. Juste à côté de notre bureau, j'ai pu entendre ronchonner pendant une bonne partie de ma thèse Baptiste Alric : merci à toi pour ton partage de la culture basque (surtout les gâteaux à vrai dire) et ton aide indispensable (c'était bien ça le mot que tu m'avais dit d'écrire ?) en C211. En face de toi, il y avait Lucie Albert, fan inconsidérée de salon de thé qui a longtemps caché son potentiel sur le dancefloor. Merci pour ces chouettes moments de danse que je garde en souvenir ! Il y avait également Paul Bruand (le délicat) et Lucas Charpin (le spontané), mes deux compagnons de randonnées pédestres et d'escalade qui vont beaucoup me manquer ! Merci Paul pour ces karaokés voiture à base de Tragédie et merci Lucas d'avoir enduré cela au volant ! J'aimerais également remercier les

autres membres de l'équipe, Jules Edwards pour son incroyable implication pour le flag rugby et Laas de Pique, Pierre Lapèze pour m'avoir fait découvrir ses talents aux Enfoiros de l'INSA, Mohammad Hussein Baz pour son franc-parler, Hyojun Kim pour sa bonne humeur, Moetassem Billah Meksassi qui a toujours le sourire, Mickaël Toubanc pour sa passion autocollant, Inès Muguet pour avoir remis un bon coup de neuf chez MILE, Olivier Liot pour nous avoir invité chez lui après les soirées, Pierre Joseph pour l'organisation des soirées barbecues, TERENCE pour ses designs « bistouquette » en group meeting, Doriane Desandre pour nos petits coups en douces durant les fêtes du labo, Aurélien Bancaud pour ses récits sur le japon. Et pour finir, j'aimerais également remercier mon stagiaire, Manaiti Gamblin, pour son enthousiasme et sa détermination pour le projet.

Je tiens également à remercier d'autres membres du laboratoire avec qui j'ai pu passer de très bons moments : Bastien Venzac et Matthieu Sagot pour la team escalade, Ianis Drobecq et Ophélie Thomas-Chemin pour les soirées, Benjamin Cerdans pour les karaokés et Olivia Peytral-Rieu pour avoir monté avec moi le projet potager LAASSticot.

Je souhaite adresser également un grand merci à Mme Juju Gandolfi, qui m'aura soutenu jusqu'au bout : ton énergie et tes vibes positives m'ont fait tellement du bien !

Je remercie également mes très chers colocos : monsieur Bidou, madame la présidente, Valdar l'ancien, Gary Guette, et La Valentitina pour leur soutien. Merci également à la team popoche et à la team corbax pour tout ces moments de détente qui m'ont fait le plus grand bien !

Et pour finir, merci à ma famille qui m'a beaucoup soutenu durant ces années.

# Table des matières

## Chapitre 1 : Introduction

<b>1. La mécanique au cœur de la compréhension du vivant.....</b>	<b>9</b>
a. Les contraintes mécaniques dans le vivant .....	10
b. La mécanique à l'échelle macroscopique .....	10
c. Les forces mécaniques générées par les cellules à l'échelle microscopique.....	12
d. A l'échelle microscopique, les cellules ressentent des forces mécaniques qui proviennent de leur micro environnement.....	17
e. Réponse cellulaire aux stimuli mécaniques : la mécanotransduction .....	21
<b>2. Dérèglement physiologique et évolution des propriétés physico-chimiques des tumeurs .....</b>	<b>27</b>
a. De l'oncogenèse à la progression tumorale .....	27
b. Des voies de signalisation anormalement actives chez les cellules tumorales .....	29
c. Evolution de l'environnement chimique d'un tissu cancéreux .....	31
d. Evolution de l'environnement mécanique d'un tissu cancéreux .....	32
<b>3. Modèles expérimentaux de contraintes compressives sur les sphéroïdes.....</b>	<b>35</b>
a. Le sphéroïde, un modèle de sous-unité tumorale.....	35
b. Compression osmotique à base de dextran .....	36
c. Systèmes de compression mécanique à bases d'hydrogels .....	37
d. Utilisation de puces microfluidiques pour la compression d'objets biologiques .....	39
<b>5. Comment traite-t-on le cancer ? .....</b>	<b>40</b>
a. Les thérapies courantes.....	40
b. Les virus oncolytiques : une alternative thérapeutique pour lutter contre le cancer ? .....	42
c. Contexte de l'utilisation des virus oncolytiques dans la thérapie du cancer .....	43
<b>6. Les principaux mécanismes liés au mode d'action des virus oncolytiques.....</b>	<b>45</b>
a. L'infection ciblée des cellules cancéreuses.....	45
b. Cycle cellulaire de la cellule hôte et réplication virale.....	45
c. L'activation du système immunitaire induite par les virus oncolytiques .....	46
d. Exploiter la réponse immunitaire préexistante pour améliorer la thérapie oncolytique contre le cancer .....	46
<b>7. Présentation de la problématique .....</b>	<b>48</b>
<b>Chapitre 2 : Développement d'une puce microfluidique haut débit pour le confinement de micro-tumeurs..</b>	<b>49</b>
<b>1. Présentation de la puce.....</b>	<b>50</b>
a. Une puce microfluidique à trois niveaux.....	51
b. Un capteur de pression intégré à la chambre .....	53
<b>2. Défis technologiques liés à la microfabrication.....</b>	<b>57</b>
a. Les premiers développements en salle blanche.....	57

b.	Optimisation de la microfabrication .....	62
<b>3.</b>	<b>Utilisation du dispositif .....</b>	<b>66</b>
a.	Chargement des échantillons .....	66
b.	Preuve de concept .....	68
c.	Mesure de la pression de croissance .....	69
d.	Récupération de l'échantillon .....	72
<b>4.</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>73</b>
a.	Conclusion .....	73
b.	Perspectives .....	74
	<b>Chapitre 3 : Pression de croissance dans un sphéroïde libre et confiné.....</b>	<b>77</b>
	<b>Partie 1 : Le cas du sphéroïde « libre ».....</b>	<b>77</b>
<b>1.</b>	<b>Les sphéroïdes stockent des contraintes solides liées à leur croissance .....</b>	<b>78</b>
<b>2.</b>	<b>Modélisation de la croissance d'une cellule dans un sphéroïde libre .....</b>	<b>80</b>
a.	Présentation de la simulation .....	81
b.	Définitions des paramètres de la simulation .....	82
c.	Calcul de la pression de croissance.....	84
d.	Estimation de la pression de Laplace.....	86
e.	Influence de la taille du sphéroïde .....	88
f.	Influence du module de Young sur la pression de croissance .....	89
<b>3.</b>	<b>Evolution de l'encombrement macromoléculaire .....</b>	<b>91</b>
a.	Résultats à 2D .....	91
b.	Résultats à 3D .....	92
<b>4.</b>	<b>Cycle cellulaire.....</b>	<b>96</b>
	<b>Partie 2 : Comment se différencient la structure mécanique, le gradient de division ainsi que l'encombrement d'un sphéroïde libre avec ceux d'un sphéroïde confiné ?.....</b>	<b>99</b>
<b>1.</b>	<b>Résultats des simulations pour un sphéroïde confiné .....</b>	<b>99</b>
<b>2.</b>	<b>Evolution de l'encombrement macromoléculaire dans un sphéroïde sous pression .....</b>	<b>100</b>
<b>3.</b>	<b>Régulation du cycle cellulaire d'un sphéroïde sous pression .....</b>	<b>103</b>
	<b>Partie 3 : Conclusion et perspectives .....</b>	<b>104</b>
<b>1.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>104</b>
<b>2.</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>107</b>
	<b>Chapitre 4 : Impact des contraintes mécaniques sur la dynamique d'infection des virus.....</b>	<b>109</b>
<b>1.</b>	<b>Le virus SG33, un virus oncolytique dérivé du virus de la myxomatose.....</b>	<b>110</b>
a.	Le virus de la myxomatose .....	110
b.	Le virus SG33 et le système ANCHOR .....	111
<b>2.</b>	<b>Etude à 2D.....</b>	<b>113</b>
a.	Principe de l'expérience et analyse .....	113



b.	Impact de la rigidité du substrat sur la dynamique de l'infection .....	116
c.	Pourquoi les cellules sont-elles rondes en fin d'infection ? .....	123
d.	Impact d'une compression unidirectionnelle sur l'efficacité d'infection du virus .....	125
e.	L'infection provoque-t-elle un encombrement de la cellule ? .....	127
<b>3.</b>	<b>Infection sur des sphéroïdes.....</b>	<b>129</b>
<b>4.</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>131</b>
a.	Conclusion.....	131
b.	Perspectives.....	132
	<b>Conclusion et perspective générale .....</b>	<b>134</b>
	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>139</b>
	<b>Annexe 1 : Expériences de fuite.....</b>	<b>139</b>
	<b>Annexe 2 : Autofluorescence tigette en verre versus tigette en film sec.....</b>	<b>140</b>
	<b>Annexe 3 : Code Matlab du programme utilisé pour analyser la déformation des membranes .....</b>	<b>141</b>
	<b>Annexe 4 : Précisions des paramètres pour la fabrication de la couche SU8 à 2µm d'épaisseur.....</b>	<b>142</b>
	<b>Annexe 5 : Formation des sphéroïdes avec la méthode de la goutte pendante.....</b>	<b>143</b>
	<b>Annexe 6 : Détermination du module de Young expérimental du PDMS .....</b>	<b>146</b>
	<b>Annexe 7 : Comparaison des courbes de pression obtenus à l'aide de deux méthodes expérimentales : croissance confinée d'un sphéroïde dans un hydrogel et croissance confinée d'un sphéroïde dans une puce microfluidique.....</b>	<b>147</b>
	<b>Annexe 8 : Détermination de l'ordre de grandeur de la tension de surface en utilisant le passage du sphéroïde d'une forme sphérique à cubique lors des premières heures de croissance dans la puce. ...</b>	<b>148</b>
	<b>Annexe 9 : Facteur de correction pour les pressions mesurées en dessous de 250Pa. ....</b>	<b>149</b>
	<b>Annexe 10 : Culture cellulaire.....</b>	<b>150</b>
	<b>Annexe 11 : Détermination des propriétés mécaniques d'un sphéroïde grâce à la technique d'aspiration par micropipette. ....</b>	<b>151</b>
	<b>Annexe 12 : Méthode pour retrouver la variation du rayon d'une cellule, de sa taille initiale à deux fois son volume .....</b>	<b>152</b>
	<b>Annexe 13 : Méthode pour retrouver la tension de surface des cellules.....</b>	<b>153</b>
	<b>Annexe 14 : Protocole permettant l'infection des cellules à 2D.....</b>	<b>155</b>
	<b>Annexe 15 : Morphologie des cellules en fonction de la rigidité des substrats.....</b>	<b>156</b>
	<b>Résumé.....</b>	<b>158</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>161</b>

# Chapitre 1 : Introduction

Dans ce chapitre, nous allons découvrir que la place de la mécanique dans le vivant est centrale d'un point de vue physiologique, tant sur le plan macroscopique que microscopique. Nous verrons également que les cellules sont non seulement sensibles aux stimuli mécaniques mais peuvent développer une réponse qui impacte leur fonction (en termes de prolifération cellulaire, différenciation, expression génétique, etc.). Nous verrons par la suite que les propriétés mécaniques des tissus sains sont très différentes de celles des tissus cancéreux. De fait, de nombreuses études montrent que la mécanique joue un rôle certain dans la progression tumorale. Nous prendrons le cas du cancer du pancréas pour illustrer ce changement des propriétés. Dans ce contexte, nous verrons qu'il existe différents systèmes (comme les hydrogels, les puces microfluidiques, etc.) qui permettent d'appliquer des contraintes mécaniques compressives sur des objets biologiques. Enfin, nous verrons qu'il existe des thérapies pour traiter les cancers mais que celles-ci présentent actuellement des limites. Une introduction sur les virus oncolytiques sera faite dans le but de présenter leur potentiel en tant qu'agent anti-cancéreux.

## 1. La mécanique au cœur de la compréhension du vivant

La mécanique est omniprésente dans le monde du vivant et se révèle être impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques se manifestant à différents niveaux : dans l'organisme dans son ensemble jusqu'aux organes, tissus et cellules. Son rôle est inhérent à certaines de nos fonctions vitales, comme nous pourrions l'observer par exemple au niveau du cœur<sup>1</sup> ou de l'intestin lors de la digestion<sup>2</sup>. S'il est plus difficile de se représenter la place de la mécanique à l'échelle microscopique, son rôle n'en est pas moins central. En effet, les cellules sont en perpétuelle interaction avec leur micro environnement et sont donc exposées à des forces extérieures qui régissent leur comportement<sup>3</sup>. Par ailleurs, nous verrons que les cellules peuvent également générer elles-mêmes des forces, lorsqu'elles sont par exemple en mouvement<sup>4</sup>.

## a. Les contraintes mécaniques dans le vivant

La mécanique dans le vivant se manifeste principalement sous formes de contraintes. Les contraintes mécaniques sont des forces internes ou externes qui agissent à la surface des structures biologiques telles que les cellules, tissus, organes ou les organismes dans leur ensemble.

Les contraintes mécaniques de tension, de compression et de cisaillement sont omniprésentes dans le monde vivant (voir Figure 1). Nous allons voir qu'elles peuvent toutes être expérimentées par le vivant et qu'elles jouent un rôle essentiel dans la structure et le fonctionnement des organismes.

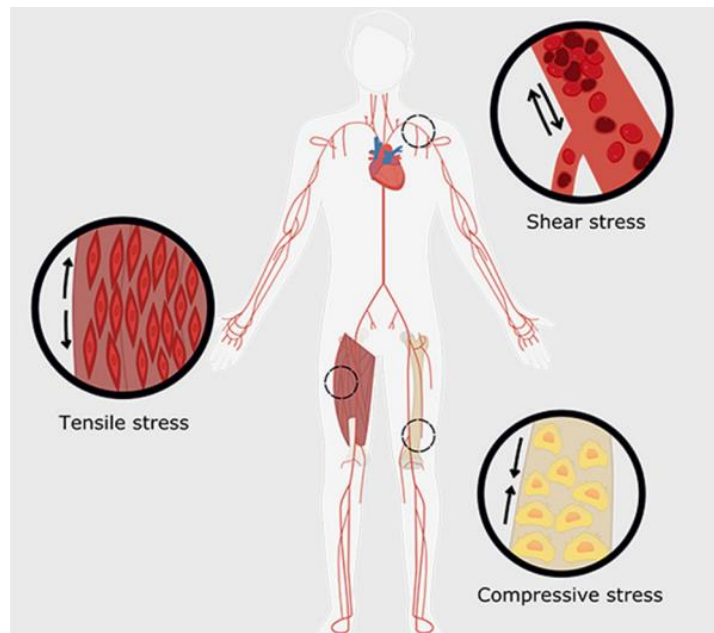
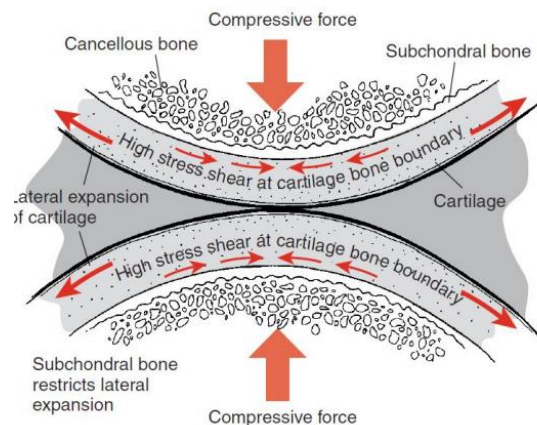


Figure 1 - Représentation schématique des contraintes mécaniques de compression et de tension (contraintes normales) et des contraintes de cisaillement (contraintes tangentielles) que l'on retrouve dans le corps humain (Melo-Fonseca *et al.*, Bio-Design and Manufacturing, 2023)<sup>5</sup>.

## b. La mécanique à l'échelle macroscopique

Cette échelle étant caractérisée par tout élément que l'on peut distinguer à l'œil nu, la présence de la mécanique peut y être illustrée au travers de multiples exemples simples. Le monde du vivant animal est soumis à des forces mécaniques internes (comme les forces musculaires<sup>6</sup>) et externes (principalement la gravité<sup>7</sup>), qui peuvent influencer structure et fonctionnement physiologique<sup>8</sup>.

Lorsque nous marchons, plusieurs forces mécaniques agissent sur notre corps. La plus évidente est sans doute la force de gravité, qui attire constamment notre corps vers le bas, en direction du centre de la Terre. Nous devons alors déployer une force supérieure au poids lorsque nous soulevons nos jambes pour avancer. De plus, en supportant notre poids, les articulations, telles que les genoux, subissent des forces compressives<sup>9</sup>. En liant les muscles aux os, les tendons subissent des forces de tension, qui permettent stabilité et coordination des mouvements<sup>10</sup>. Enfin, nos articulations subissent des contraintes de cisaillement lors de leur mouvement de rotation<sup>11</sup> (voir Figure 2).



**Figure 2 - Schéma illustrant les contraintes de cisaillement dans les articulations (Mansour, Biomechanics of cartilage, 2013).**

Un exemple plus impressionnant est sans doute celui du cœur, qui témoigne d'une activité mécanique forte afin de propulser le sang dans l'ensemble de l'organisme et cela malgré la force de gravité. Notamment, les grands animaux font faces à un challenge important puisque leur système cardiovasculaire doit être suffisamment puissant pour alimenter leur cerveau en sang sans endommager les organes et tissus localisés en dessous du cœur, qui peuvent présenter des œdèmes suite à une pression artérielle trop intense. La girafe, par exemple, a une pression artérielle près du cœur qui est environ deux fois supérieure à celle des hommes pour pouvoir alimenter son cerveau<sup>12</sup>. Plusieurs adaptations physiologiques à la gravité (augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire ainsi que de la membrane basale des capillaires sanguins) permettent à la girafe de prévenir la formation des œdèmes dans ses pattes.

En réalité, il y a une profonde interconnexion entre les forces mécaniques que nous venons d'aborder à l'échelle macroscopique et celles qui se manifestent à l'échelle microscopique. Les forces mécaniques à grande échelle, que ce soit la tension, la compression ou le cisaillement, sont transmises à travers les tissus biologiques jusqu'aux cellules, où elles peuvent engendrer des déformations, des contraintes ou des réponses cellulaires spécifiques. Par exemple, nos os, à l'échelle macroscopique, résistent à des forces de compression qui se transmettent à l'échelle du tissu et de la cellule<sup>13</sup> (voir Figure 3). À l'inverse, les cellules peuvent générer d'elles-mêmes des forces mécaniques qui peuvent être à l'origine d'un mouvement visible à l'échelle macroscopique. Par exemple, lorsque nos muscles se contractent, ce sont en réalité des milliers de cellules musculaires qui génèrent des forces microscopiques de tension.

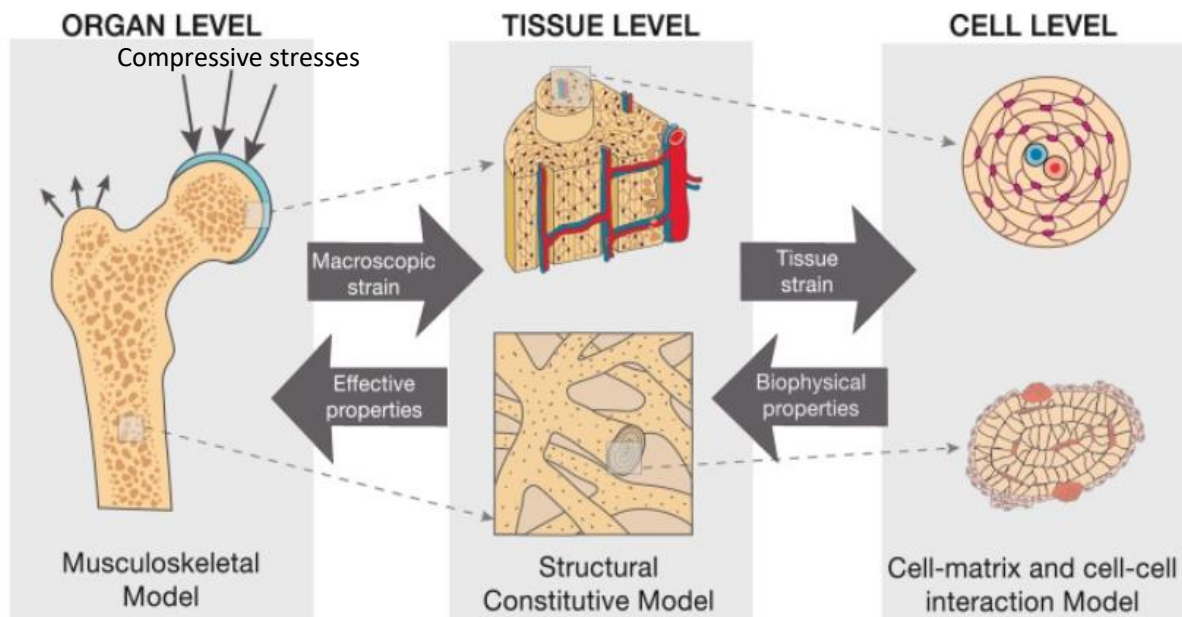


Figure 3 - Schéma montrant l'interconnexion entre les forces mécaniques compressives que subissent les os et leur transmission à l'échelle du tissu et de la cellule (Garcia-Aznar, Bone, 2021).

### c. Les forces mécaniques générées par les cellules à l'échelle microscopique

Cette échelle fait référence à tous les objets biologiques, de la centaine de cellules aux molécules ou particules subcellulaires, qui sont trop petits pour être visibles à l'œil nu.

#### *Le cytosquelette : support mécanique de la cellule*

Le cytosquelette est la structure mécanique de la cellule. C'est un réseau de biopolymère complexe qui comprend de l'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires (voir Figure 4).

Les filaments d'actine sont fins (environ 7nm), ils sont souvent localisés sur les bords de la cellule mais peuvent s'étendre d'une extrémité à l'autre de la paroi cellulaire en de long filament d'une dizaine de micromètres (appelées fibres de stress). Ils correspondent aux filaments de couleurs bleus sur la Figure 4. A l'équilibre, l'une de leur extrémité peut polymériser en se liant à l'ATP tandis que l'autre peut dépolymériser aussitôt après hydrolyse de l'ATP en ADP<sup>14</sup>. Différentes protéines ainsi que des moteurs moléculaires de la famille des myosines sont capables d'interagir avec les filaments d'actine<sup>15</sup>. Ensemble, ils peuvent favoriser l'extension ou la contraction des filaments. Ils participent ainsi à la fois au maintien de la forme de la cellule ainsi qu'aux mouvements de celle-ci.

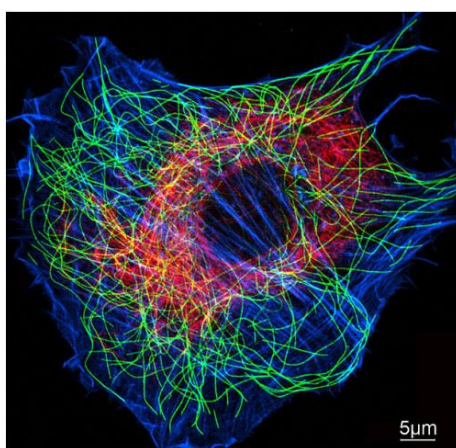


Figure 4 - Image des filaments d'actine (en bleu), des filaments intermédiaires (en rouge) et des microtubules à l'intérieur (en vert) d'une cellule eucaryote. (Pollard et al., Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2018<sup>16</sup>)

Les microtubules sont des filaments de 25nm de diamètre qui peuvent atteindre plusieurs dizaines de micromètres en longueur. Ils correspondent aux filaments verts sur la Figure 4. Ils sont impliqués dans l'une des fonctions majeures de la cellule : la mitose. Durant cette phase du cycle cellulaire, les microtubules ont par exemple un rôle essentiel lors de la ségrégation des chromosomes. Ce sont notamment grâce à des protéines motrices de la famille des kinésines (comme les kinésines associées au centromère – MCAK), que l'extrémité des microtubules peut dépolymériser<sup>17</sup>. Cette dépolymérisation joue par exemple un rôle très important lors de la formation du fuseau mitotique et du mouvement des chromosomes. Les cellules cancéreuses présentent généralement une dérégulation des MCAK qui provoque une désorganisation du réseau de microtubules. Cela peut entraîner une instabilité génomique qui augmente l'agressivité du cancer<sup>18</sup>.

Les filaments intermédiaires sont des assemblages résistants de protéines qui ont un diamètre allant de 8 à 12nm. Ils sont localisés autour du noyau (ils correspondent aux filaments rouges sur la Figure 4). Contrairement aux filaments d'actine et aux microtubules, les filaments intermédiaires forment un réseau stable qui participe au maintien de la forme cellulaire ainsi qu'à l'ancrage des organites de la cellule<sup>19</sup>. Ces filaments jouent également un rôle dans l'adhérence de la cellule car ils sont en étroite connexion avec les desmosomes (points d'ancrage du cytosquelette). Par ailleurs, ils sont également très extensibles : dans les cellules

musculaires, sous l'effet des contraintes mécaniques de tension, ils peuvent atteindre une longueur d'environ 2,5 fois plus grande avant de se casser<sup>20</sup>.

Le cytosquelette constitue une structure dynamique qui permet le mouvement (migration cellulaire) et la prolifération (croissance et division) des cellules. Nous allons aborder brièvement par quels mécanismes les cellules sont capables de générer des forces mécaniques sur leur micro environnement lors de la migration cellulaire, puis nous allons nous focaliser sur les forces mécaniques que les cellules génèrent lors de la croissance et de la division cellulaire.

### *La cellule génère des forces de traction sur son micro environnement*

Les cellules sont capables de générer des forces mécaniques impliquées dans des mécanismes biologiques tels que la migration cellulaire<sup>4</sup>. Les cellules qui constituent les tissus ont des points d'ancrage, que l'on appelle points focaux (qui sont interconnectés au réseau d'actine), qui leur permettent d'adhérer à la matrice extracellulaire via des protéines transmembranaires de la famille des intégrines<sup>21</sup>. C'est grâce à ces points focaux, qui lient les cellules à leur micro environnement, que les cellules génèrent des forces de traction qui leur permettent de migrer ou de s'ancrer dans la matrice extracellulaire (voir Figure 5)<sup>22</sup>.

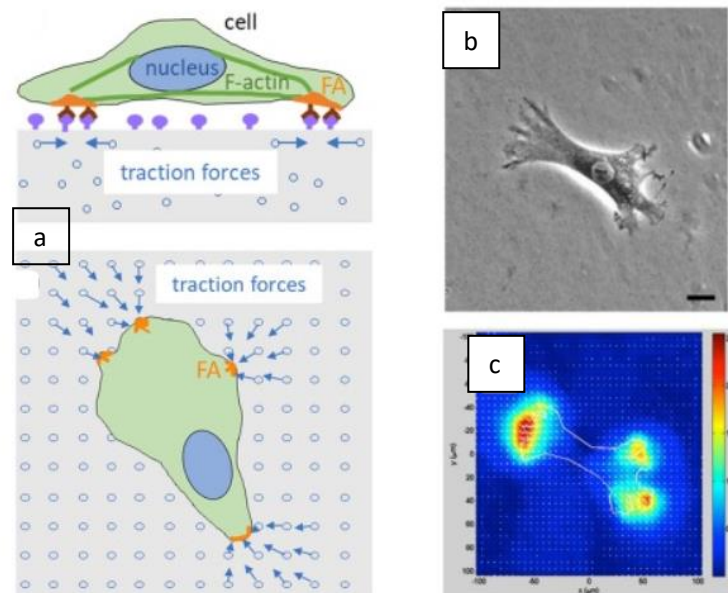


Figure 5 – a. Schématisation d'un essai de traction : la cellule est cultivée sur un substrat élastique comportant des billes fluorescentes. La cellule génère des forces qui déforme le substrat. b. Image d'une cellule cultivée sur un substrat de ce type. d. Cartographie des forces exercées par la cellule sur le substrat. (Lekka et al., Micron, 2021)<sup>22</sup>

*La croissance et la division cellulaire sont associées à la génération de forces*

Le cycle cellulaire est un processus durant lequel des forces mécaniques générées par les cellules elles-mêmes entrent en jeu. Avant de les détailler, voici une brève description des différentes phases du cycle, qui sont représentées sur la Figure 6 :

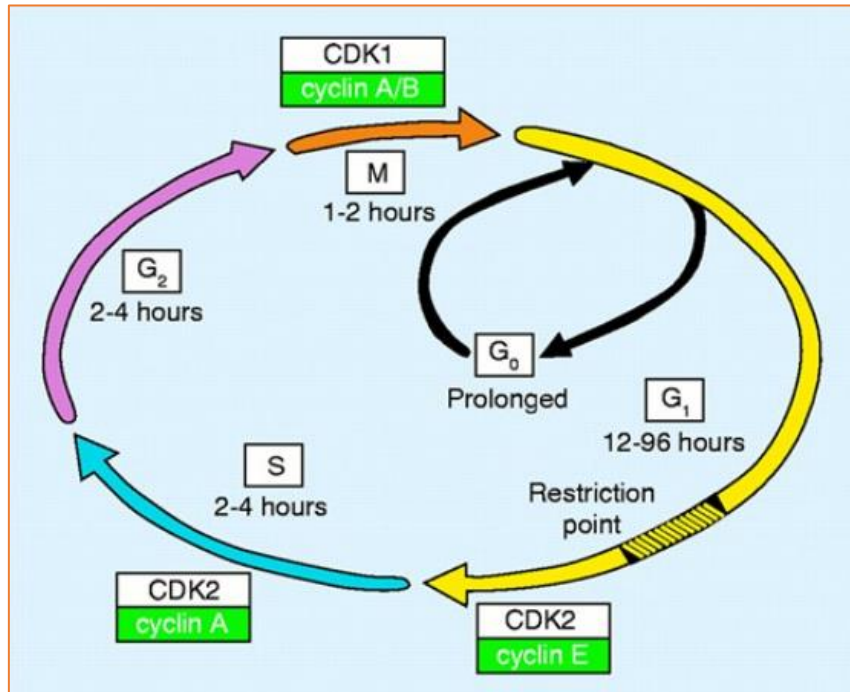


Figure 6 - Représentation des 4 phases du cycle cellulaire et de la phase G<sub>0</sub> (Israels *et al.*, The Oncologist, 2000)<sup>23</sup>.

Le cycle cellulaire se compose de quatre phases nommées G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> et M (voir Figure 6). La phase de synthèse correspond à la phase S lors de laquelle la quantité d'ADN est doublée. La cellule entre ensuite dans la phase M lors de la mitose où a lieu la séparation de la cellule mère en deux cellules filles (fin du cycle cellulaire). Il existe des phases « intervalle » présentes entre ces phases. Le premier intervalle a lieu en phase G<sub>1</sub> après la phase M, où la phase de croissance et de préparation à la réplication se met en place. Cette phase assure l'engagement de la cellule dans le cycle cellulaire grâce à un point de contrôle, le point de Restriction, qui ne permet le passage en phase S que lorsque certaines conditions sont remplies<sup>23</sup>. Par exemple, si des cassures au niveau des brins d'ADN sont présentes, cela entraîne l'arrêt du cycle cellulaire<sup>24</sup>. Par ailleurs, le passage de la cellule au-delà de ce point de restriction nécessite également la présence de facteurs de croissance, dans le cas contraire, la division cellulaire est interrompue et la cellule entre en phase de quiescence (phase G<sub>0</sub>)<sup>25</sup>. Le deuxième intervalle a lieu en G<sub>2</sub>, après la phase S et représente la phase de préparation de la mitose (cette phase permet notamment de vérifier si l'ADN est correctement répliqué à travers un point de contrôle



dédié)<sup>23</sup>. La croissance de la cellule, qui correspond à son augmentation de volume, a lieu quant à elle tout le long du cycle cellulaire.

Durant le cycle cellulaire, la cellule opère des changements morphologiques qui nécessitent le développement de forces mécaniques dont certaines sont exercées sur le micro environnement qui l'entoure. Dans un premier temps, la cellule croît durant le cycle pour, en moyenne, doubler son volume : ceci nécessite de déplacer son environnement local. Nous parlons alors de pression de croissance (nous discutons plus bas ce point particulier). De plus, durant la mitose, la cellule augmente rapidement son volume et s'arrondit (phénomène connu sous le nom de « mitotic cell rounding<sup>26</sup> » en anglais). Dans le cas d'une cellule appartenant à un tissu épithélial de type cubique comme représenté sur la Figure 7a, les forces nécessaires à sa croissance sont toutes dirigées vers l'extérieur de la cellule, contre les cellules voisines ainsi que la matrice extracellulaire<sup>27</sup>. Les forces permettant l'arrondissement de la cellule dépendent de l'actomyosine ainsi que de la capacité de la cellule à réguler son osmolarité<sup>28</sup>. La force permettant l'arrondissement de la cellule en elle-même est générée par la pression osmotique, en revanche, la contraction de l'actomyosine est nécessaire pour contrebalancer la pression osmotique et réguler le volume de la cellule<sup>28</sup>. Des mesures faites au Microscope à Force Atomique (AFM) ont permis d'évaluer ces forces qui représentent une centaine de nano newtons en ordre de grandeur<sup>28,29</sup>.

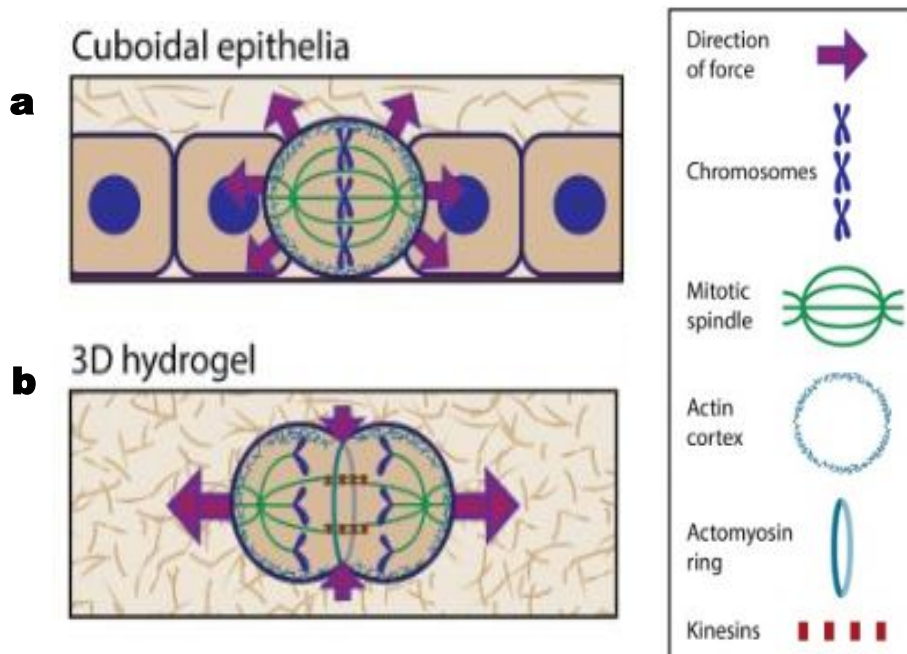


Figure 7 – a. Représentation des forces mécaniques extracellulaires développée par la cellule lors de l'arrondissement de sa forme en début de mitose. b. Représentation des forces mécaniques extracellulaires développées par la cellule lors de la division cellulaire. (Gupta *et al.*, Trends in Cell Biology, 2022)

Dans le cas d'une cellule qui est sur le point de se diviser au sein d'un tissu ou d'une matrice comme un hydrogel (voir Figure 7b), les cellules génèrent des forces mécaniques anisotropes dirigées vers l'extérieur (contre le micro environnement) via l'élongation du faisceau mitotique, qui est en majeure partie composé de microtubules<sup>30</sup>. Notons qu'il y a également la présence de forces dirigées vers l'intérieur de la cellule qui sont générées par l'actomyosine lors de la cytokinèse, et qui sont associées à des forces dirigées vers l'extérieur de la cellule le long de l'axe de division<sup>31</sup> (voir Figure 7b).

#### d. A l'échelle microscopique, les cellules ressentent des forces mécaniques qui proviennent de leur micro environnement

Le micro environnement qui entoure la cellule peut modifier ses propriétés mécaniques (comme la rigidité cellulaire<sup>32</sup>) ou encore exercer des forces sur les cellules, telles que la tension, la compression ou le cisaillement<sup>33</sup>. Ces forces peuvent agir à plusieurs échelles pour former des tissus et des organes entiers au travers de structures tridimensionnelles complexes qui répondent à une fonction<sup>34,35</sup>.

Une contrainte représente une force par unité de surface, qui peut être exprimée en  $N/m^2$  ou en Pa, comme la pression.

- Les contraintes mécaniques de tension

Lorsque la force s'exerce dans un plan perpendiculaire à la surface de la cellule et est dirigée vers l'extérieur de façon à tendre la cellule, on parle de contraintes mécaniques de tension (voir Figure 8).

Les cellules constituant la paroi alvéolaire des poumons sont soumises à des contraintes de tension cycliques qui sont dues à l'aspiration de l'air lors de la respiration.

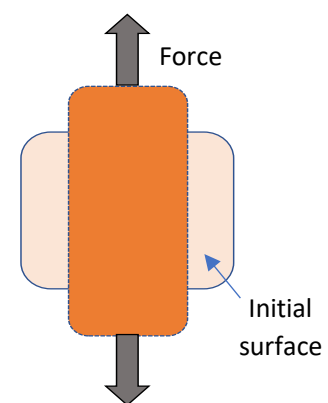


Figure 8 - Schématisation d'une contrainte mécanique de tension. (Di-Luoffo *et al.*, Trends in Biochemical Sciences, 2021)

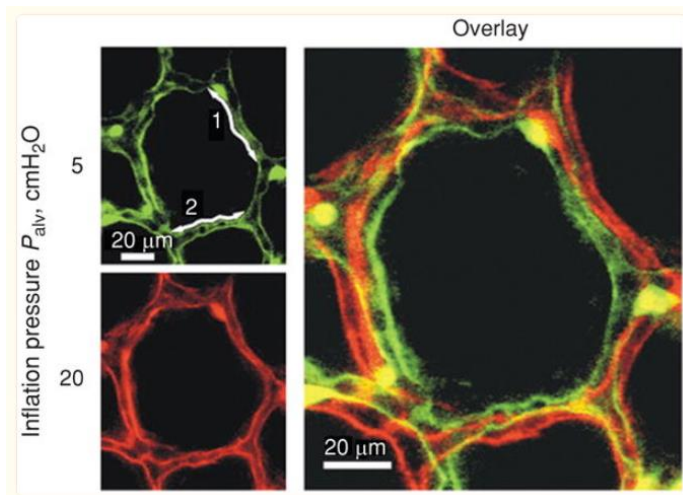


Figure 9 – Distension des alvéoles avant l'hyperinflation (couleur verte) et après (couleur rouge) (Waters et al., Comprehensive Physiology, 2012).

Lorsque les poumons se gonflent d'air, les alvéoles se déforment et leur diamètre peut augmenter de 15% lors d'une hyperinflation (alvéole colorée en rouge sur la Figure 9) comparée à leur diamètre initiale (alvéole colorée en vert sur la Figure 9)<sup>36</sup>.

- Les contraintes mécaniques de cisaillement

Une cellule peut également subir des contraintes de cisaillement (voir Figure 10). Ces contraintes

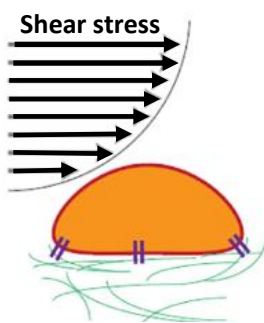


Figure 10 - Représentation d'une cellule subissant des contraintes de cisaillement. (Di-Luoffo et al., Trends in Biochemical Sciences, 2021)

proviennent d'une force qui s'exerce de manière parallèle à la surface de la cellule. Les cellules endothéliales qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins sont un exemple incontournable pour illustrer les contraintes de cisaillement. Lorsque le sang circule dans les vaisseaux, il exerce une force physique parallèle aux parois du vaisseau.

Les contraintes de cisaillement ont une incidence sur la morphologie de la cellule<sup>37</sup>. Lorsqu'une mono couche de cellules endothéliales est cultivée en conditions statiques (sans circulation du milieu, image (a,c) de la Figure 11, les cellules semblent s'orienter aléatoirement. En revanche, lorsqu'une mono couche de cellules endothéliales est cultivée sous l'effet d'une circulation unidirectionnelle du milieu de culture (image (b,d) de la Figure 11), les cellules s'orientent dans le sens de la circulation du milieu de culture et prennent une forme allongée. Les contraintes de cisaillement induisent une réorganisation du cytosquelette comme on peut le voir au niveau des filaments d'actine qui sont également orientés dans le sens de la force de cisaillement (image (d) de la Figure 11). De plus, les contraintes de cisaillement semblent diminuer le volume cellulaire<sup>38</sup>.

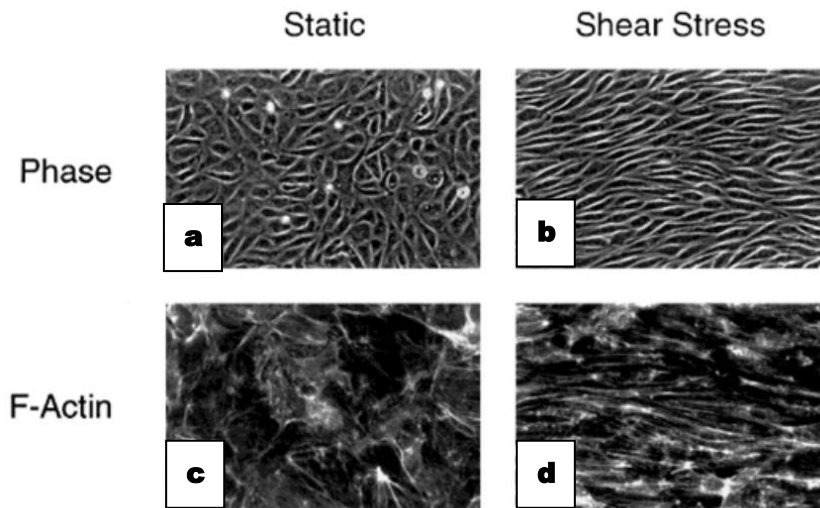


Figure 11 – (a,c) : Cellules cultivées en conditions statiques (pas de circulation du milieu de culture). (b,d) : Cellules exposées pendant 24h à des contraintes de cisaillement induites par la circulation du milieu de culture (de la gauche vers la droite). (c,d) : Images en fluorescence du réseau d'actine. (Malek *et al.*, Journal of Cell Science, 1996).

- Les contraintes mécaniques compressives

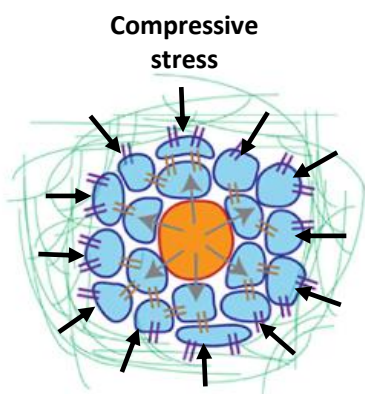


Figure 12 - Représentation d'une cellule subissant des contraintes compressives. (Di-Luoffo *et al.*, Trends in Biochemical Sciences, 2021)

Lorsque la force s'exerce de façon perpendiculaire à la surface de la cellule et qu'elle est dirigée vers la cellule, la cellule subit des contraintes mécaniques compressives (voir Figure 12).

Les cellules subissent un certain nombre de contraintes compressives dans notre corps. Nous avons déjà évoqué la présence de contraintes compressives au niveau des cellules présentes dans les articulations. Par ailleurs, il y a encore beaucoup d'autres cas où les cellules expérimentent le même type de contraintes.

Par exemple, la pression exercée sur les dents entraîne l'apparition de contraintes compressives durant la mastication des aliments. Ces contraintes peuvent être de l'ordre d'une quarantaine de MPa sur les molaires pour un aliment dur comme de la viande et être deux fois plus élevées dans le cas d'aliments plus rigides (aussi dur que les os par exemple)<sup>39</sup>. Bien sûr, ces contraintes dépendent d'un certain nombre de facteurs : l'âge de la dent, sa forme, sa préservation, etc.

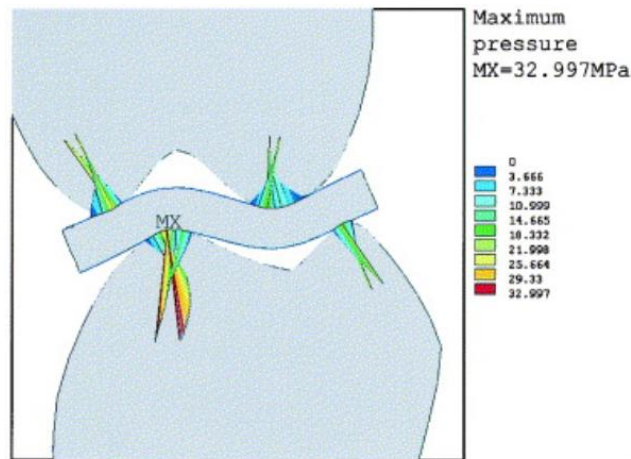


Figure 13 – Représentation de la pression entre deux molaires lors de la mastication d'un morceau de viande dure (Dejak *et al.*, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2023)

Enfin, les contraintes compressives jouent également un rôle lors de la prolifération cellulaire. Les cellules appartenant à des tissus doivent pousser contre les barrières physiques de leur micro environnement ainsi que les cellules voisines afin de proliférer, ce qui entraîne l'apparition de contraintes mécaniques compressives et l'émergence d'une pression induite par la croissance des cellules. La pression induite par la croissance des cellules réduit la croissance et la division des cellules mammifères<sup>40-42</sup>. Ainsi, lorsque des amas de cellules sphériques (appelés sphéroïdes) sont inclus dans des hydrogels, leur croissance dépend de la rigidité de l'hydrogel qui les entoure (voir Figure 14)<sup>43</sup>. Les sphéroïdes confinés dans un hydrogel « rigide » (module de Young de 16kPa) durant 14 jours, atteignent une taille environ 30% plus petite que des sphéroïdes confinés dans des hydrogels « mous » (module de Young de 3kPa).

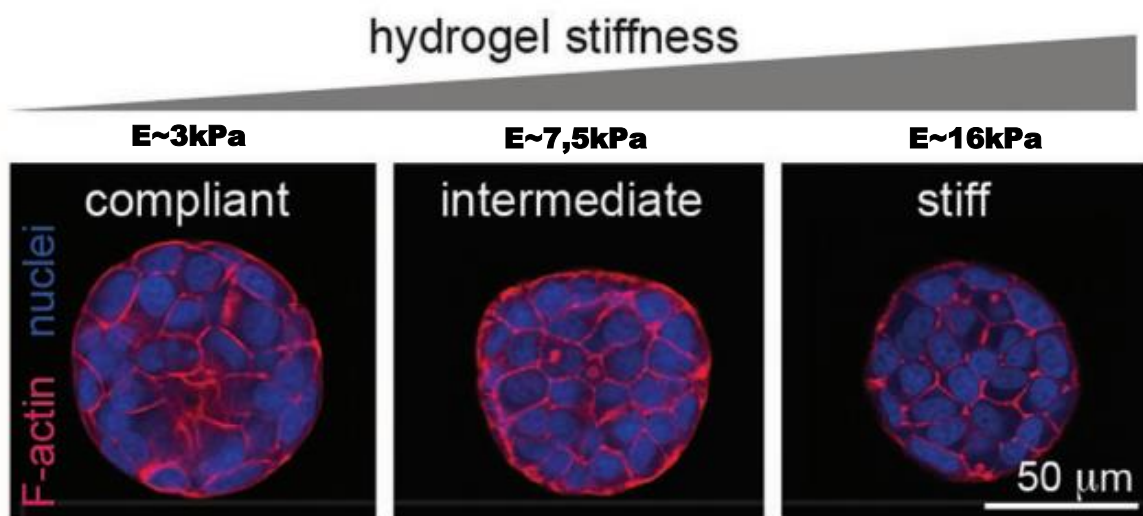


Figure 14 - Images au confocal de l'actine (en rouge) et du noyau (en bleu) marqués dans un sphéroïde confiné dans un hydrogel dont le module de Young vaut environ : 3kPa (image de gauche), 7,5kPa (image du milieu) et 16kPa (image de droite). (Figure adaptée de l'article de Taubenberger *et al.*, *Advanced Biosystems*, 2019)

L'impact des contraintes mécaniques compressives sur les cellules ainsi que la notion de pression induite par la croissance des cellules ont été l'objet de plusieurs études fondamentales au cours de ma thèse.

- Les trois types de contraintes peuvent être expérimentées en même temps

Les cellules peuvent également subir une combinaison de toutes ces forces mécaniques. C'est le cas des cellules épithéliales de l'intestin, qui subissent des forces de tension, de compression et de cisaillement (voir Figure 15)<sup>2</sup>.

Lors de l'ingestion de nourriture, les cellules épithéliales expérimentent des contraintes de tension à mesure que le bolus de nourriture traverse la lumière de l'intestin, ainsi que des contraintes de cisaillement par le fluide qui s'écoule. La contraction péristaltique du muscle sous l'effet du passage des aliments dans l'intestin entraîne également l'apparition simultanée de contraintes de distension et de compression.

Le cancer est une pathologie où toutes les contraintes se retrouvent : la tension par une augmentation de la rigidité du micro environnement ; la compression par la pression de croissance ou par une pression extrinsèque venant d'un électro-gonflage de la matrice extracellulaire ; enfin du cisaillement lorsque des cellules tumorales se retrouvent en circulation.

#### e. Réponse cellulaire aux stimuli mécaniques : la mécanotransduction

Une cellule est capable de percevoir un signal mécanique en provenance de son micro environnement et de le transformer en un signal biologique. Ce phénomène est connu sous le nom de mécanotransduction et permet à la cellule de réagir ou éventuellement de s'adapter aux stimuli mécaniques<sup>44</sup>.

Nous allons voir que les mécanosenseurs (les molécules capables de percevoir les signaux mécaniques) peuvent être présents à différents niveaux dans une cellule : sur la membrane cytoplasmique, dans le cytoplasme, et sur la membrane nucléaire.

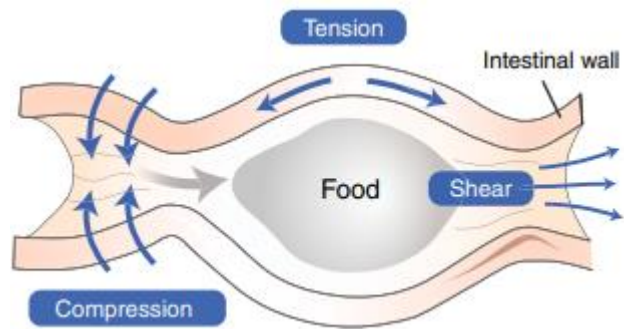


Figure 15 - Schéma représentant les trois types de contraintes présentes dans l'intestin (tension, compression, cisaillement). Illustration provenant de l'article Houtekamer *et al.*, *Current Biology*, 2022.

### *Les mécanosenseurs présents à la surface de la membrane cytoplasmique*

Comme cela a été mentionné précédemment, les cellules possèdent des points focaux qui leurs permettent d'adhérer à la matrice extra cellulaire mais également de ressentir les forces de tension qui proviennent de leur micro environnement<sup>45</sup>. La plupart des complexes d'adhésion sont mécanosensibles, et fonctionnent par des changements de conformation des protéines lorsque celles-ci sont étirées ; ces changements de conformation ouvrent des sites cryptiques qui peuvent être phosphorylés par des kinases spécifiques.

Ainsi, un stimulus mécanique peut déclencher des réactions chimiques en cascades à l'intérieur de la cellule, que l'on appelle voies de signalisations. Ces dernières comportent en aval des facteurs de transcription qui peuvent être activés ou inactivés selon le type de contrainte mécanique perçue. Cela aura pour effet d'activer ou d'inhiber la synthèse des gènes ciblés par les facteurs de transcription. Voici deux exemples de facteurs de transcription mécanosensibles ayant des rôles distincts :

- La  $\beta$ -caténine, qui est localisée dans le noyau uniquement lorsqu'elle est phosphorylée et qui permet d'activer des gènes impliqués dans la prolifération de la cellule<sup>46</sup>.
- YAP et son homologue TAZ, présents naturellement dans le noyau des cellules lorsqu'ils ne sont pas phosphorylés et activant des gènes également impliqués dans la prolifération. A l'inverse, une fois activés, ils sont relocalisés dans le cytoplasme puis dégradés, ce qui a un effet anti-prolifératif<sup>47</sup>.

Par ailleurs, le déclenchement d'une voie de prolifération peut être provoqué par différents types de mécanosenseurs. Il existe par exemple des canaux ioniques, qui sont des protéines membranaires contrôlant le passage d'un ou plusieurs ions<sup>48</sup>. Les canaux ioniques Piezo1 et 2 sont des exemples de canaux ioniques qui sont perméables aux ions cationiques tels que l'ion Sodium ( $\text{Na}^+$ ), l'ion Potassium ( $\text{K}^+$ ), l'ion Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et l'ion Manganèse ( $\text{Mg}^{2+}$ )<sup>49</sup>. Les protéines Piezo sont particulièrement grandes et sont composées d'environ 2500 acides aminés<sup>50</sup>. Il a été montré que ces canaux s'ouvrent plus fréquemment lorsque la membrane plasmique est déformée par des changements de tension<sup>49,51</sup>. De plus, le canal Piezo1 qui est majoritairement présent dans les cellules endothéliales, est indispensable à la mécanotransduction des forces de cisaillement provoquées par l'afflux du sang dans les vaisseaux sanguins<sup>52</sup>(voir Figure 16). Le rôle de Piezo dans la réponse à la compression en 3D n'a jamais été montré, bien que ce type de canaux aient un effet lorsque les cellules sont décomprimées (ce qui peut être relié à une augmentation de la tension membranaire<sup>53</sup>).

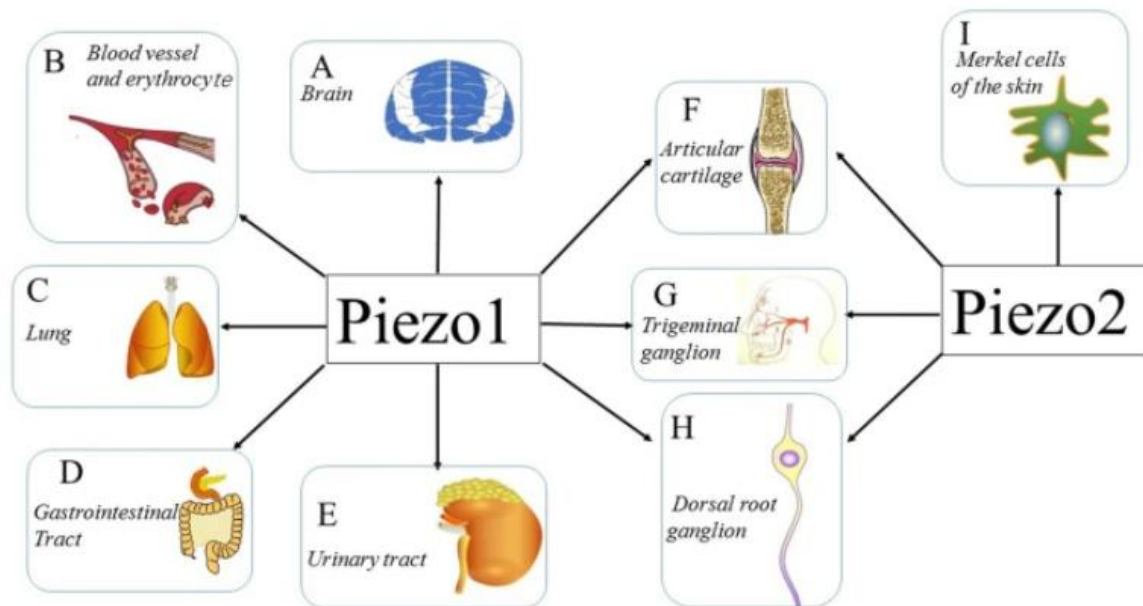


Figure 16 - a-e : Illustration du rôle vital de Piezo 1 dans le cerveau, les vaisseaux sanguins, les poumons, le tube digestif ainsi que les voies urinaires. f-h: expression simultanée de Piezo1 et Piezo2 dans le cartilage des articulations, le ganglion trigéminal et le ganglion de la racine dorsale. (Fang *et al.*, Cell & Bioscience, 2021)

Piezo1 a un rôle vital dans d'autres organes tels le cerveau, les poumons, le tube digestif ainsi que les voies urinaires<sup>50</sup>. L'expression simultanée de Piezo1 et Piezo2 a été observée dans le cartilage des articulations, le ganglion trigéminal, et le ganglion de la racine dorsale. Par ailleurs Piezo2 lui, s'exprime dans les cellules Merkel de la peau.

### *Mécanotransduction dans le compartiment cytoplasmique*

Il se peut également que les forces mécaniques soient détectées directement (sans la présence de récepteurs), en agissant sur les paramètres physiques de la cellule tels que l'encombrement macromoléculaire<sup>54</sup>.

Les cellules animales, les levures et les bactéries ont des cytoplasmes qui sont occupés par un grand nombre de macromolécules. Elles peuvent occuper jusqu'à 40% du volume de la cellule à une concentration allant de 100 à 300mg/mL<sup>55,56</sup>. L'intérieur d'une cellule est donc un environnement encombré qui peut impacter le mouvement des molécules ou la conformation des protéines. Cependant, une augmentation de l'encombrement peut également favoriser l'attraction de plusieurs macromolécules et aboutir à la formation de grands complexes macromoléculaires grâce à des effets entropiques<sup>57,58</sup>.

Les réactions chimiques peuvent être soit favorisées par un encombrement moléculaire qui facilite leur rapprochement ou à l'inverse être possiblement inhibées par un encombrement macromoléculaire trop important, qui empêchent la diffusion des molécules.



L'encombrement macromoléculaire, avec son potentiel d'impacter directement n'importe quelle réaction biochimique dans la cellule, est donc un paramètre physique très important à étudier. Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'encombrement macromoléculaire en réalisant des mesures micro rhéologiques, faites au moyen de nanoparticules fluorescentes génétiquement encodées par les cellules (nanoparticules vertes sur l'image Figure 17b), appelées GEMs<sup>55</sup>.

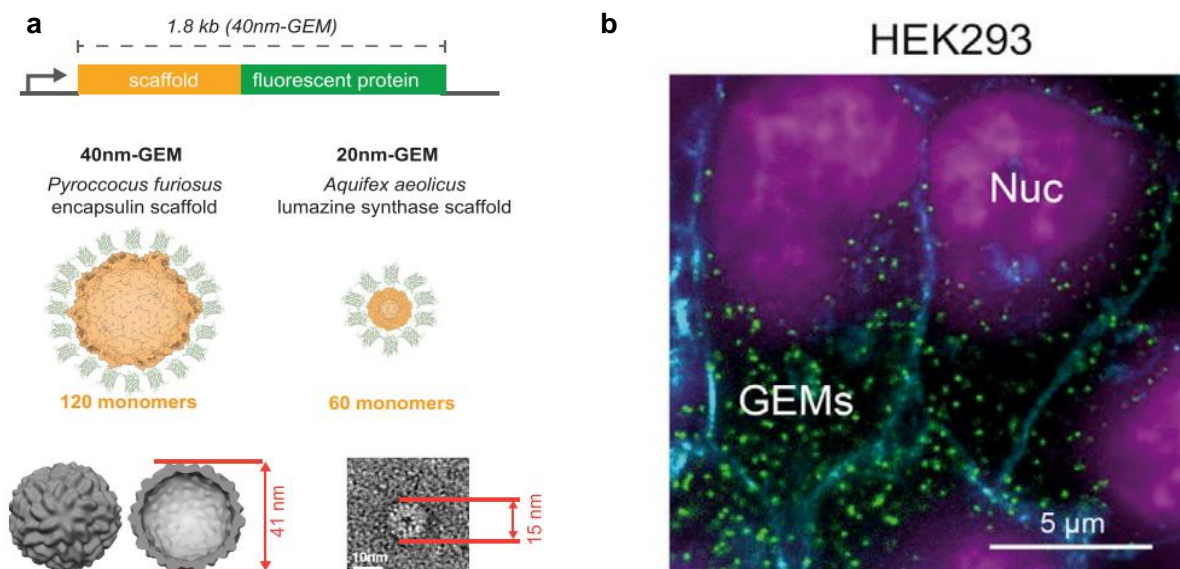


Figure 17 - a. Structure des GEMs. b. Photo des GEMs dans les cellules HEK293 : issue de l'article Delarue et al., Cell, 2018)

Ces nanoparticules sont composées d'un squelette de protéines pouvant multimériser et s'auto-assembler afin de former des sphères de tailles spécifiques (20 ou 40nm) décorées par des protéines fluorescentes (GFP) (voir Figure 17a).

Ainsi, la mesure du coefficient de diffusion de ces nanoparticules, qui diffusent dans le cytoplasme, permet de caractériser l'encombrement macromoléculaire des cellules : plus la diffusion est grande, plus l'encombrement est faible, et inversement.

Nous avons pu voir précédemment quels étaient les impacts de l'encombrement macromoléculaire sur les réactions chimiques. Mais quels sont les paramètres qui peuvent influencer l'encombrement macromoléculaire à l'intérieur de la cellule ?

Théoriquement, toute contrainte mécanique, tout signal chimique, ou toute altération génétique peuvent modifier l'encombrement<sup>54,55</sup>. En effet, toutes ces conditions peuvent perturber l'homéostasie cellulaire, augmenter une réaction au détriment d'une autre, changer les taux d'associations ou la régulation du volume cellulaire ou de sa biomasse.

Chez les levures, il a été montré récemment que la pression induite par la croissance des cellules dans un environnement spatialement confiné accentuait fortement l'encombrement macromoléculaire dans le cytoplasme et dans le noyau, avec une forte dépendance en taille<sup>59</sup>. Ainsi, le coefficient de diffusion est environ 2 à 3 fois plus faible pour des GEMs de 40nm lorsque les cellules subissent une pression induite par la croissance de 0,5MPa (voir Figure 18). De plus, des particules de plus petites tailles sont moins impactées par une augmentation de l'encombrement. Enfin, l'encombrement augmente aussi dans le noyau avec la pression de croissance, et diminue notamment la mobilité d'un locus d'ADN.

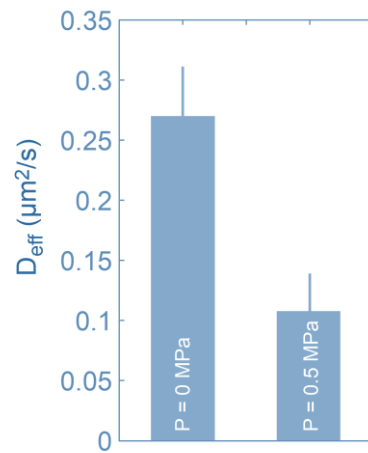


Figure 18 - Mesures du coefficient de diffusion chez les levures en fonction de la pression de croissance.

#### *Mécanotransduction au niveau de l'enveloppe nucléaire*

Les contraintes mécaniques peuvent également déformer le noyau qui peut éventuellement déclencher une réponse grâce au complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton en anglais). Ce dernier couple la lamine nucléaire à l'actine, aux microtubules cytoplasmiques et encore aux filaments intermédiaires grâce à des protéines connectées entre la membrane interne (protéine de la famille SUN) et externe (protéine de la famille des Nesprines) du noyau<sup>60-63</sup>(voir Figure 19).

Le complexe LINC est impliqué dans la structuration du noyau et tient le rôle de mécanosenseur en transformant les stimuli mécaniques provenant de la matrice extracellulaire en signaux biochimiques<sup>64</sup>. Ainsi, la cellule peut s'adapter à son micro environnement en modifiant à la fois l'organisation du cytosquelette et du noyau ainsi que l'expression de certains gènes<sup>65,66</sup>.

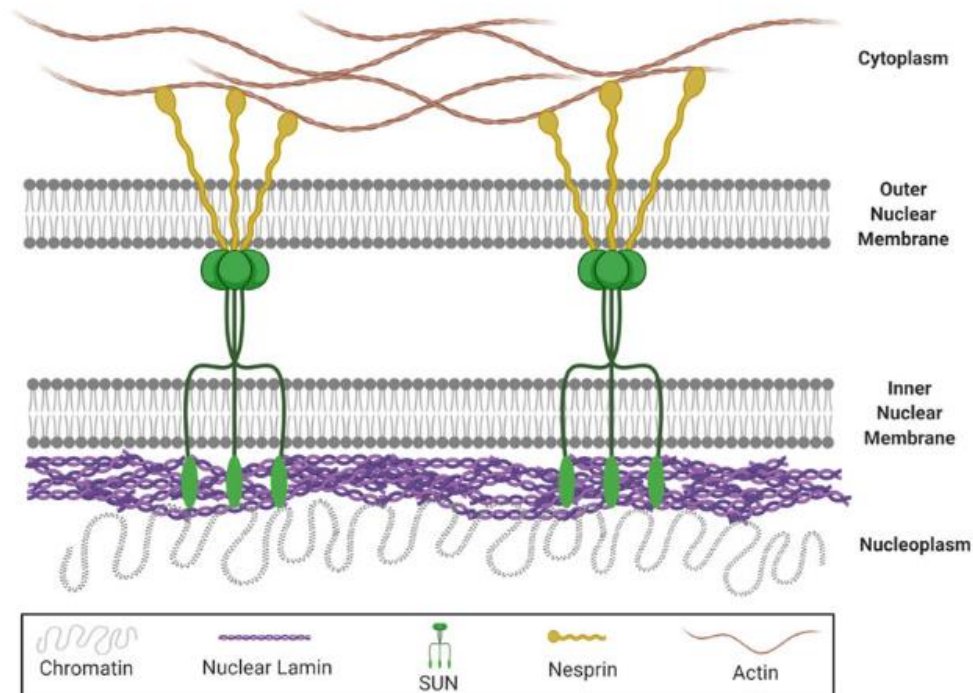


Figure 19 - Schéma du complexe LINC (tiré de l'article Alcorta-Sevillano *et al.*, *Cells*, 2020<sup>63</sup>)

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, le noyau est également un endroit encombré par les cellules, dont l'encombrement augmente sous pression de croissance chez les levures. Cette augmentation pourrait impacter de nombreux processus, de la transcription à la synthèse de l'ADN<sup>54</sup>.

Pour conclure, la première partie de ce chapitre nous a permis de comprendre à quel point la mécanique était inhérente au bon fonctionnement de nos organes. Elle se manifeste principalement par l'apparition de forces de tension, de cisaillement et de compression dans le vivant. Les cellules peuvent ressentir ces forces (au travers de la mécanotransduction) mais également les générer (lors de la prolifération cellulaire par exemple). Par ailleurs, d'un point de vue pathologique et plus particulièrement dans le cas du cancer, les forces mécaniques de tension, de cisaillement et de compression sont étroitement liées à la progression tumorale. En ce qui concerne les contraintes mécaniques compressives, elles entraînent une diminution de la prolifération cellulaire. Ce type de contrainte mécanique se manifeste dans la majorité des tumeurs solides car les cellules cancéreuses ont la particularité de se diviser de manière incontrôlée.

## 2. Dérèglement physiologique et évolution des propriétés physico-chimiques des tumeurs

---

### a. De l'oncogénèse à la progression tumorale

L'oncogénèse, ou cancérogénèse, est un processus biologique complexe qui conduit à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse<sup>67</sup>. Son déroulement se décompose en trois phases majeures : l'initiation, la promotion et la progression tumorale<sup>68</sup> (voir Figure 20).

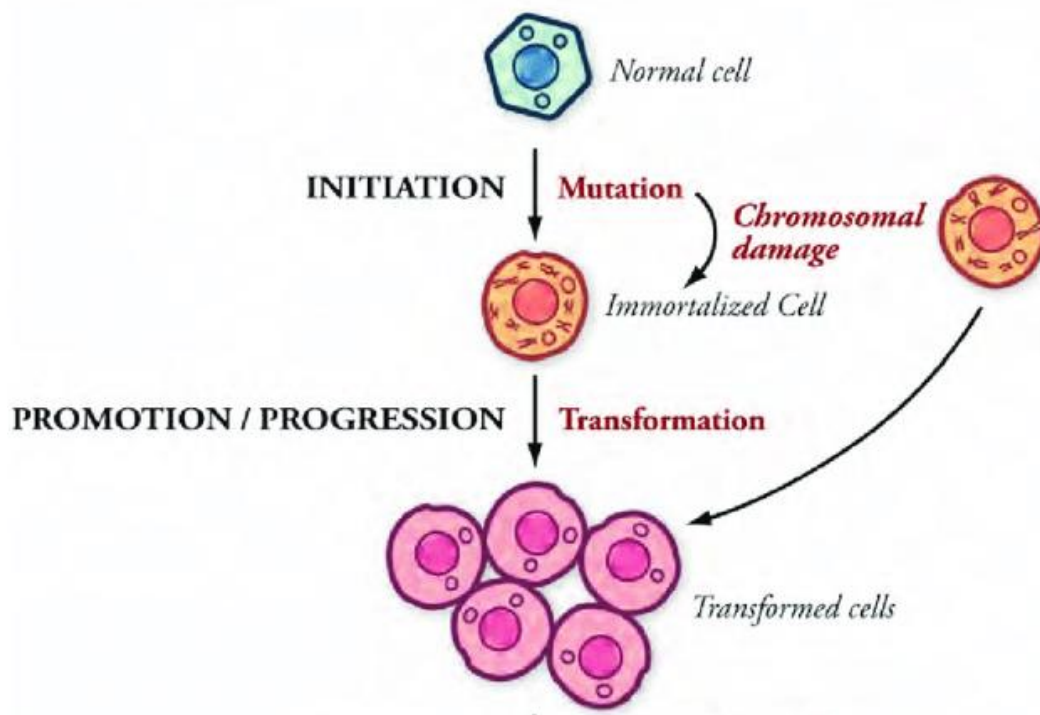


Figure 20 - Description brève de l'initiation, la promotion et la progression tumorale dans le processus de cancérogénèse (tiré de l'article Trompa *et al.*, DNA Repair and Human Health, 2011<sup>69</sup>).

La phase d'initiation est marquée par une instabilité génétique accrue<sup>70</sup>. En effet, le génome des cellules peut subir des altérations génétiques spontanées ou induites par une substance cancérogène. D'une manière générale, les mutations génétiques peuvent avoir des effets qui impactent à la fois le comportement et la réponse cellulaire et peuvent mener à des dérèglements au niveau des voies de signalisation associées à la prolifération cellulaire, la communication cellulaire ainsi qu'à la différenciation<sup>71</sup>.

Cependant, l'oncogenèse ne se limite pas à l'apparition d'anomalies intrinsèques. Ces dix dernières années, de nombreuses observations ont mis en exergue l'importance des interactions entre les cellules et leur environnement lors du stade pré-tumoral et tumoral<sup>72</sup>. Par exemple, dans le cas du cancer du pancréas, l'inflammation des tissus peut amplifier un signal oncogénique et favoriser la prolifération cellulaire ainsi que l'instabilité génétique<sup>73,74</sup>. Un autre paramètre pouvant prédisposer un tissu sain à se transformer en tissu cancéreux est la plasticité cellulaire. Cela fait référence à la capacité de la cellule à adopter différentes identités parmi un large spectre de phénotypes. La perte de l'identité de la cellule et de sa fonction peut en effet elle-aussi participer à la mise en place de l'oncogenèse<sup>75</sup>.

La phase de promotion se déclenche lorsque la cellule initialement transformée se développe et prolifère jusqu'à former un groupe de cellule identiques. C'est un processus multi-étape qui implique l'exposition prolongée et répétée des cellules à un promoteur. Les promoteurs peuvent être endogènes (facteur de croissance, hormones, etc.) ou exogènes (substances chimiques toxiques, facteurs alimentaires, etc.)<sup>68,76</sup>. De plus, cette phase est également liée à une perte progressive de la différenciation cellulaire dû à la mutation de gènes critiques (gènes suppresseurs de tumeur, oncogènes, etc.), ce qui contribue à l'instabilité génomique des cellules.

La progression tumorale est marquée par l'apparition de sous-populations de cellules tumorales due à une accumulation d'altérations génétiques<sup>71,77</sup>. Cette phase peut durer plusieurs années chez l'homme<sup>78</sup>. A ce stade, les cellules peuvent avoir différents phénotypes : croissance cellulaire rapide, développement d'un système vasculaire tumoral, capacité à envahir les tissus environnants, etc.<sup>68,78</sup>. Ainsi, les cellules cancéreuses forment une tumeur dite « maligne ». Ce sont des masses de cellules cancéreuses qui sont capables d'envahir d'autres organes (métastases) ou de détruire les tissus adjacents.

La transformation cellulaire entraîne des modifications du micro environnement. Le micro environnement des cellules cancéreuses est connu sous le nom de stroma tumoral. Celui-ci diffère du micro environnement sain de par sa composition biochimique et ses propriétés mécaniques mais également par une réorganisation orchestrée par les cellules cancéreuses (contrôle des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules immunes, etc.)<sup>72</sup>.

## b. Des voies de signalisation anormalement actives chez les cellules tumorales

Les cellules cancéreuses ont une signalisation cellulaire altérée qui impacte la régulation des fonctions cellulaires. Cela se manifeste par une prolifération cellulaire excessive, une résistance accrue à la mort cellulaire par apoptose (mort programmée de la cellule), ainsi qu'une capacité à envahir les tissus voisins<sup>79</sup>.

Il y a donc des voies de signalisation anormalement activées ou inhibées dans les cancers. Voici quelques-unes de ces voies, présentées de manière succinctes :

- La voie de signalisation Src et FAK (Focal Adhesion Kinase) :

Cette voie est associée à la motilité ainsi qu'à l'invasion<sup>80</sup>. Src et FAK sont des tyrosines kinases non associées à un récepteur. Ces kinases sont situées au niveau des points d'ancrages qui existent entre la cellule et la matrice extracellulaire qui régulent la signalisation des intégrines<sup>81</sup>.

La rigidité des tissus cancéreux, qui augmente lors de la progression tumorale, a été identifiée comme l'un des facteurs favorisant la croissance de la tumeur<sup>82</sup>. L'augmentation de la rigidité de la tumeur peut déclencher des voies de signalisation impliquant des kinases, parmi lesquelles, Src et FAK sont les plus reconnues<sup>83,84</sup>.

- La voie de signalisation RAS/ERK :

Cette voie est impliquée au travers de différentes fonctions dans la cellule : la régulation de la prolifération, la survie, la différenciation, la migration cellulaire ainsi que l'angiogenèse<sup>85</sup>. Cette voie est majoritairement activée par des récepteurs membranaires comme l'EGFR ou par des mutations sur des gènes codant la protéine RAS ou la protéine RAF (voir Figure 21). Ces mutations sont très présentes dans de nombreux cancers.

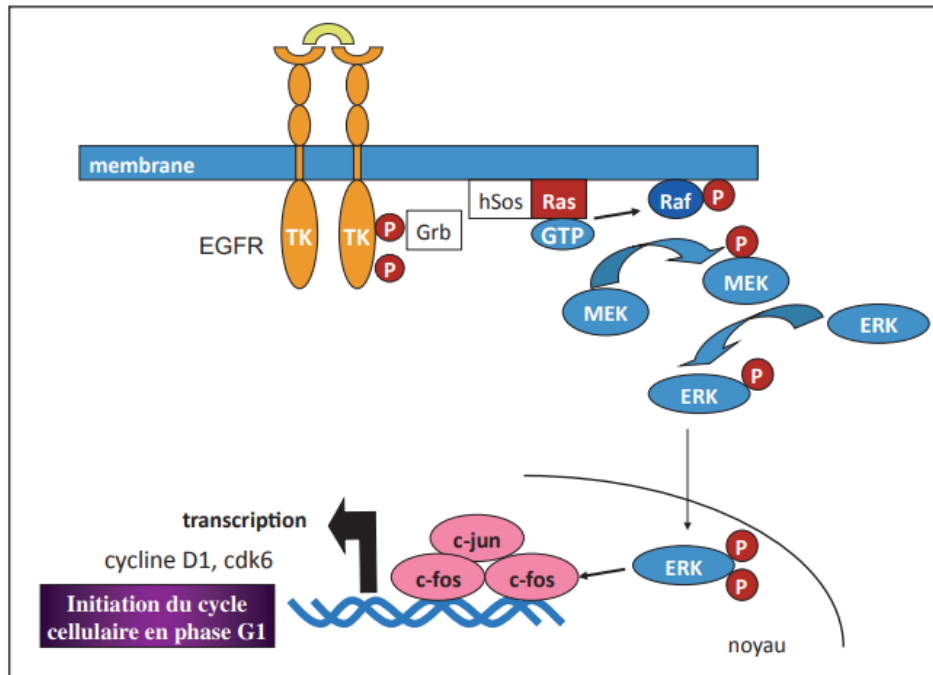


Figure 21 - Schéma simplifié de la voie de signalisation intracellulaire RAS/ERK (Lièvre *et al.*, *Cancéro Dig. II*, 2010)

- La voie de signalisation membranaire PI3K :

PI3K est une kinase présente au niveau de la membrane cytoplasmique. De par sa localisation sur la membrane, PI3K a été identifié comme l'un des (mécano-)senseurs majoritairement activés lors de changements chimiques et/ou mécaniques à l'extérieur de la cellule<sup>86</sup>. Au sein des tumeurs solides, l'activité des PI3Ks augmente<sup>87,88</sup>.

Cette voie permet de réguler la croissance cellulaire, la motilité ainsi que la survie des cellules. Cette voie est majoritairement active lorsque la cellule est exposée à des contraintes mécaniques de tension<sup>89,90</sup>, de compression<sup>91,92</sup>, ou encore de cisaillement<sup>93,94</sup>.

- La voie de signalisation intracellulaire YAP/TAZ :

Cette voie que nous avons présentée dans la partie précédente est particulièrement active dans le cas de nombreux cancer (dont le cancer du poumon<sup>95</sup>, le cancer du sein<sup>96</sup>, le cancer du pancréas<sup>97</sup>, etc.)<sup>98</sup>. En particulier, cette voie est impliquée à la fois dans le processus d'initiation et de progression lors de la cancérogenèse<sup>98</sup>.

Enfin, la signalisation de YAP/TAZ a également un rôle dans la résistance thérapeutique face à de nombreux traitements<sup>99,100</sup>.

### c. Evolution de l'environnement chimique d'un tissu cancéreux

Le cancer est souvent reconnu comme étant une maladie de la signalisation cellulaire mais c'est également une maladie du métabolisme. L'alimentation au sein du micro environnement tumoral n'est pas homogène et la diffusion de l'oxygène est limitée pour les zones de la tumeur qui sont trop éloignées des vaisseaux sanguins (voir Figure 22)<sup>101</sup>.

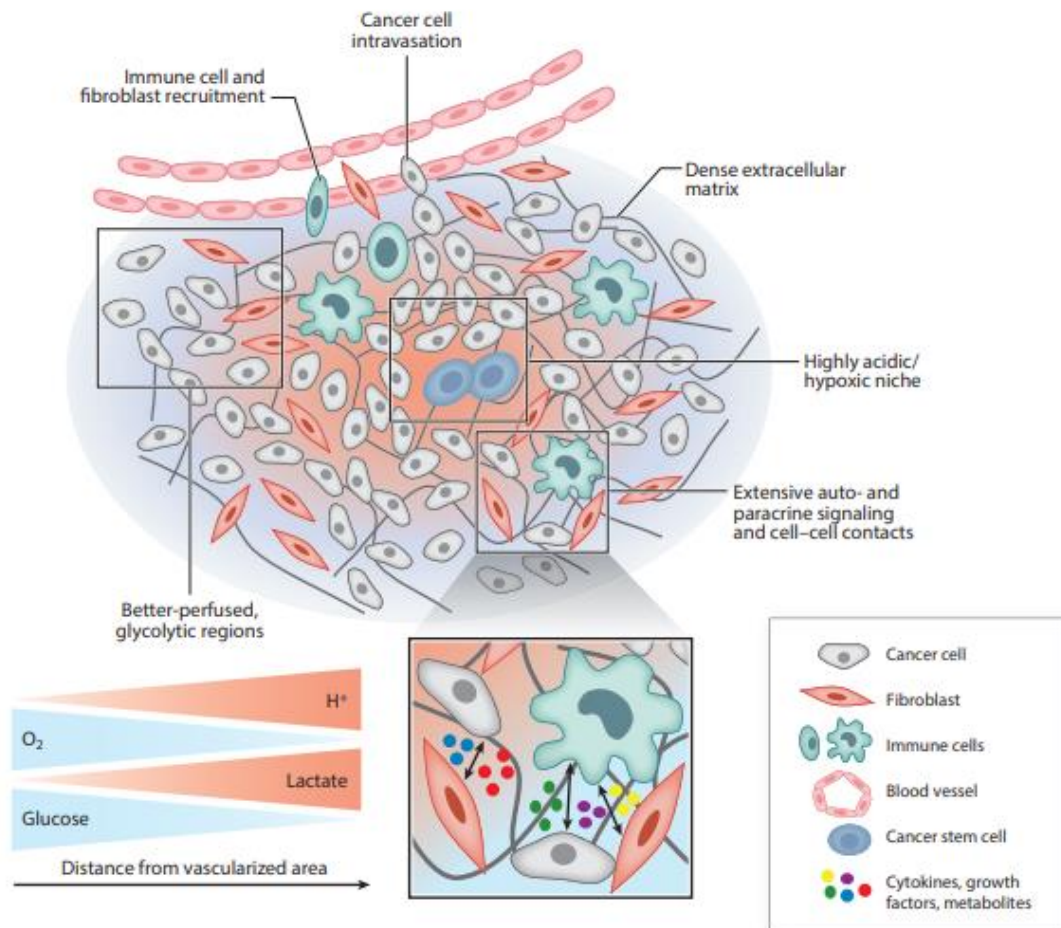


Figure 22 - Description du micro environnement tumoral. (Tiré de Boedtkjer *et al.*, Annual Review of Physiology, 2020<sup>101</sup>).

Les cellules qui n'ont pas suffisamment d'oxygène pour procéder à la respiration aérobie ont recours à la fermentation (ou respiration anaérobie) afin de couvrir leurs besoins énergétiques<sup>102</sup>. L'acide lactique étant l'un des produits obtenu à l'issue de ce processus métabolique, son accumulation locale provoque une acidification du micro environnement tumoral<sup>101</sup>. Les valeurs de pH mesurées au sein du micro environnement tumoral peuvent atteindre 6,5, tandis que le pH mesuré dans les tissus sains est d'environ 7,3<sup>101,103,104</sup>.



Par ailleurs, une étude très intéressante montre que même les cellules cancéreuses qui ont accès à un taux d'oxygène suffisant pour procéder à la respiration cellulaire aérobie, ont également recours à la fermentation : ce phénomène a été nommé « effet Warburg »<sup>105</sup>. Son origine est encore mal comprise, d'autant plus que la fermentation anaérobie permet de produire seulement 2 molécules d'adénosine-triphosphate (ATP, molécule permettant de produire de l'énergie grâce au groupement phosphate qu'elle contient) tandis qu'en comparaison, la respiration aérobie permet de produire 36 ATP (voir Figure 23).

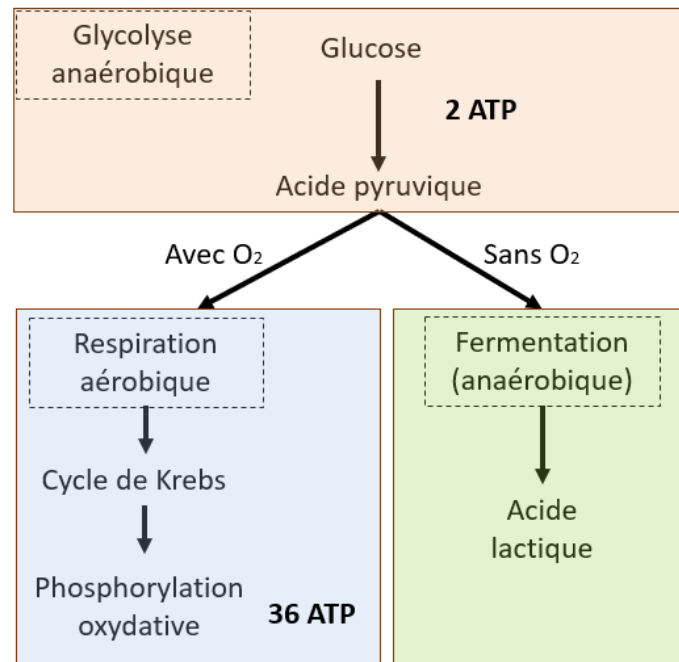


Figure 23 - Schéma simplifié de la respiration aérobie et de la fermentation cellulaire.

L'acidification du milieu influence fortement la progression tumorale<sup>106,107</sup>. En effet, elle stimule l'invasion et la création de métastase<sup>106,108</sup>. Elle peut également induire la dégradation de la matrice extracellulaire et son remodelage.

#### d. Evolution de l'environnement mécanique d'un tissu cancéreux

D'une manière générale, les tumeurs solides sont des amas de cellules qui évoluent dans un espace spatialement limité par leur micro environnement. Tout comme les levures (voir partie I, c. de ce chapitre), les cellules cancéreuses subissent une pression induite par leur croissance dans un espace confiné. Cela impacte la croissance de la tumeur et la progression tumorale<sup>109,110</sup>.

### Le cas du cancer du pancréas

Le cancer du pancréas est une maladie fatale, avec un taux de survie aux USA ne dépassant pas 10% cinq ans après la détection de la maladie. Cette maladie est diagnostiquée tardivement, en raison de symptômes peu spécifiques (fatigue, maux de ventre, etc.). Le seul traitement curatif de ce cancer est la chirurgie<sup>73</sup>. Le cancer du pancréas est résistant à de nombreux traitements médicamenteux administrés lors des chimiothérapies, comme la gemcitabine par exemple<sup>111</sup>. Il est caractérisé par une forte desmoplasie (formation en excès de tissu conjonctif à l'intérieur et au contact de la tumeur), qui contribue à la chimiorésistance et qui diminue également les chances de succès d'un traitement par chirurgie<sup>112</sup>. Les propriétés mécaniques (contraintes solides induites par la croissance des cellules, rigidité de la matrice extracellulaire, etc.) qui caractérisent le micro environnement tumoral, jouent un rôle prépondérant dans la progression tumorale et la résistance des cellules cancéreuses à certains médicaments<sup>113,114</sup>.

Dans le cas du cancer du pancréas, la croissance des cellules dans un environnement confiné entraîne une diminution du taux de cellules prolifératrices<sup>115</sup>. En réalisant des expériences où un amas de cellules sphérique (appelé sphéroïde) est inclus dans un hydrogel en agarose (voir Figure 24a), les auteurs de cette étude, menée par l'équipe MILE du LAAS-CNRS dans laquelle je réalise ma thèse, montrent qu'un médicament couramment utilisé en chimiothérapie (gemcitabine) qui cible les cellules prolifératrices n'est plus efficace lorsque les sphéroïdes ont une croissance confinée (voir Figure 24b). En effet, la plupart des agents chimiothérapeutiques ciblent les cellules en prolifération : sous pression, il y a moins de cellules en prolifération et donc moins de cibles, et ainsi une efficacité des agents chimiothérapeutiques diminuée.

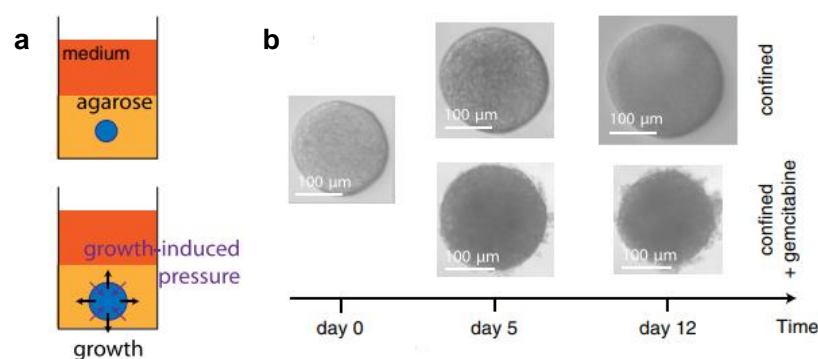


Figure 24- a. Schéma d'un sphéroïde confiné dans un hydrogel en agarose. b. Image d'un sphéroïde confiné dans de l'agarose (contrôle) et d'un autre sphéroïde confiné dans de l'agarose en présence de gemcitabine. (Rizzuti *et al.*, Physical Review Letter, 2020)

Grâce à des mesures d'élastographie ondulatoire à 2D (2D Shear Wave Elastography en anglais), l'équipe de Julie Guillermet-Guibert avec laquelle nous collaborons au CRCT a pu mesurer la rigidité d'une tumeur pancréatique *in vivo* chez la souris. La cartographie de la rigidité du pancréas de la Figure 25a met en évidence une augmentation globale de l'élasticité du tissu cancéreux et met également en lumière une certaine hétérogénéité de la rigidité au sein de la tumeur, avec des zones très fortement rigidifiées par rapport à d'autres.

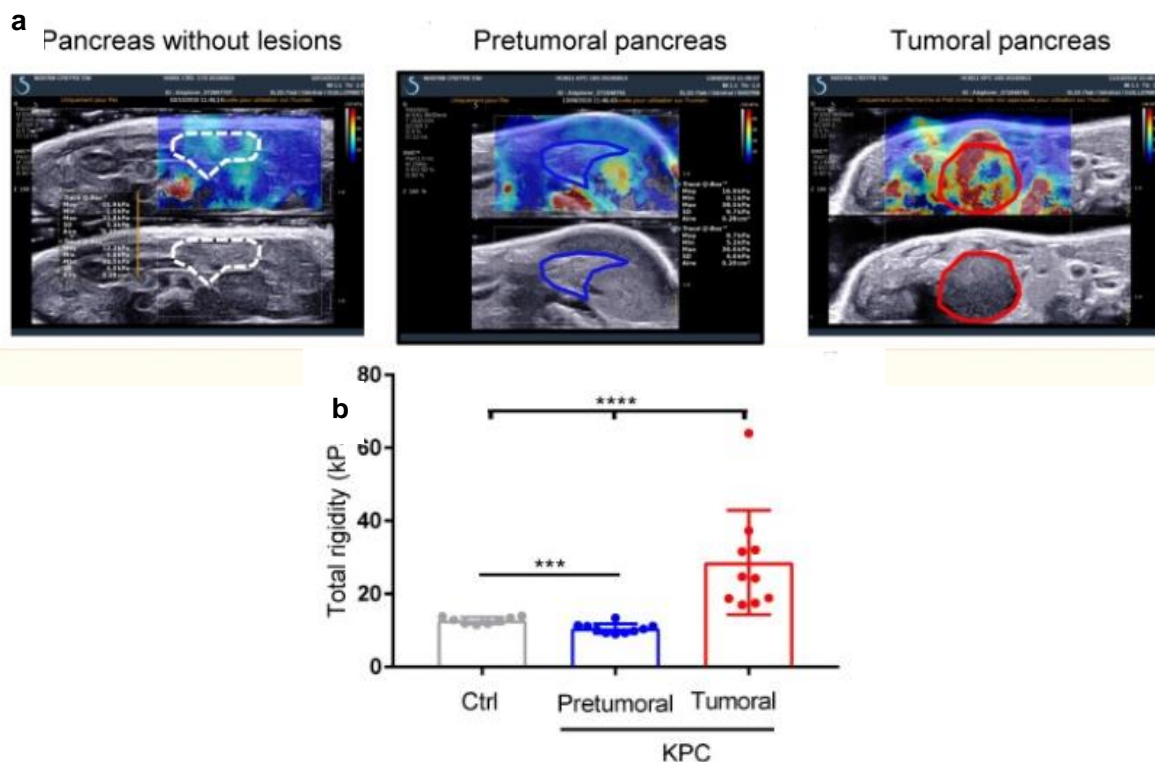


Figure 25 - a. Cartographie des mesures de rigidité faite *in vivo* chez la souris. b. Présentation des mesures de rigidité dans le cas d'un pancréas sain, dans le cas d'un stade pré-tumoral, et dans le cas d'une tumeur. (Therville *et al.*, Theranostics, 2019).

On peut également voir sur la Figure 25b que de la rigidité est légèrement plus faible que la normale durant le stade pré tumoral tandis qu'elle est environ deux fois plus élevée lors du stade tumoral.

Pour conclure, les propriétés mécaniques des tissus cancéreux ont un impact important sur la progression tumorale. Il existe déjà de nombreux systèmes permettant de simuler des contraintes mécaniques de cisaillement ou des contraintes de tension<sup>116,117</sup>. En revanche, les dispositifs permettant de reproduire des contraintes mécaniques compressives et plus particulièrement de confiner spatialement des objets biologiques présentent des limites. Dans ce contexte, nous

avons essentiellement étudié l'impact des contraintes compressives sur la croissance de microtumeurs et développer une puce microfluidique permettant de palier les limitations que nous avons identifiées dans les systèmes déjà existants et qui sont présentés dans la partie suivante.

### 3. Modèles expérimentaux de contraintes compressives sur les sphéroïdes

#### a. Le sphéroïde, un modèle de sous-unité tumorale

Une micro-tumeur *in vivo* est composée d'un ensemble de cellules cancéreuses liées les unes aux autres (voir Figure 26a). Elles possèdent des interactions non négligeables avec leur micro environnement appelé matrice extra-cellulaire. A cette échelle, la micro-tumeur est entourée de vaisseaux sanguins qui sont chargés en nutriments et en oxygène<sup>118</sup>. La présence d'un gradient de diffusion des nutriments et de l'oxygène peut engendrer une structuration du tissu où les cellules situées à proximité des vaisseaux sanguins prolifèrent tandis que les cellules présentes au milieu de la tumeur forment un cœur nécrotique. Une tumeur constitue donc un ensemble non-homogène caractérisé par des gradients chimiques. Dans le cas de nombreux cancers, la distance entre le cœur nécrotique et les vaisseaux sanguins varie entre 50 et 250 $\mu\text{m}$ <sup>118</sup>.

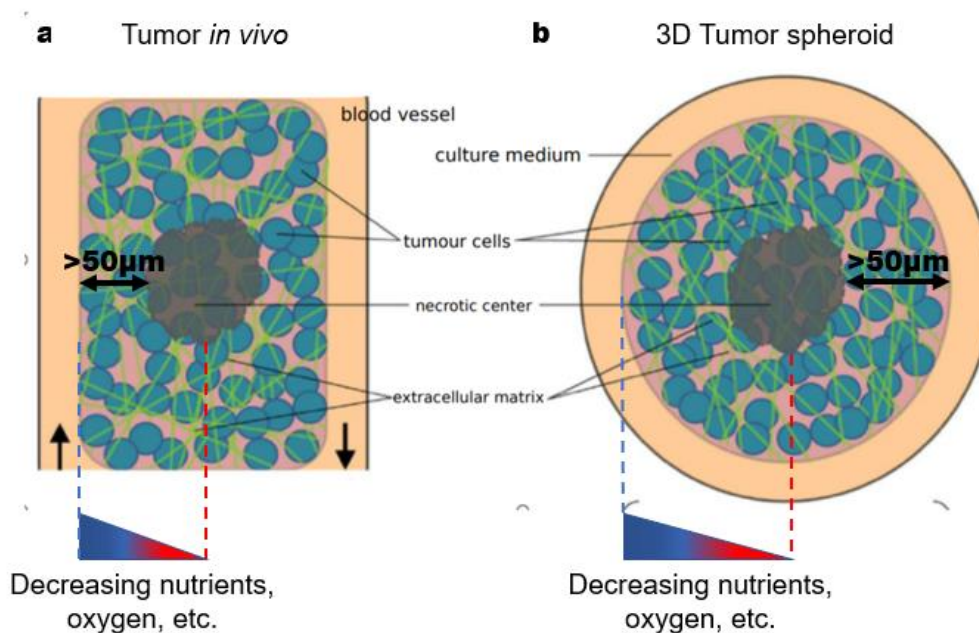


Figure 26 - a. Schéma simplifié d'une micro-tumeur. b. Schéma simplifié d'un sphéroïde multicellulaire. (Figure adaptée à partir de l'article Phang *et al*, revue cancer, 2011).

L'une des approches utilisées pour étudier les micro régions tumorales consiste à utiliser des sphéroïdes. Ils permettent de récapituler la structure tri-dimensionnelle qui caractérise les tissus cancéreux et de reproduire les interactions cellule-cellule et cellule-micro environnement<sup>118,119</sup>. Ce modèle de tumeur est un intermédiaire en termes de complexité entre les expériences réalisées sur des cellules cultivées à 2D et les expériences faites sur des modèles animaux.

Le cœur du sphéroïde peut devenir nécrotique en raison de la présence d'un gradient de diffusion des nutriments et de l'oxygène qui tend à diminuer la concentration de ces espèces à mesure que l'on s'écarte de l'extrémité du sphéroïde (Figure 26b). La distance entre le cœur nécrotique et la surface du sphéroïde peut varier entre 50 et 300 $\mu\text{m}$  selon les lignées cellulaires<sup>118</sup>.

La formation d'un sphéroïde résulte d'un effet provenant de la tension de surface et de réarrangements visqueux au sein d'un agrégat cellulaire. Lors de cet arrangement, les cellules glissent les unes par rapport aux autres pour former un ensemble sphérique, qui l'est d'autant plus que la tension de surface est grande.

Durant ma thèse, nous avons choisi de fixer la taille des sphéroïdes à 100 $\mu\text{m}$  de diamètre (voir Figure 27) afin de s'affranchir des éventuels gradients chimiques qu'il peut y avoir dans des sphéroïdes de plus grandes tailles. Pour préparer les sphéroïdes, nous avons eu recours à deux méthodes qui sont décrites en annexe 5.

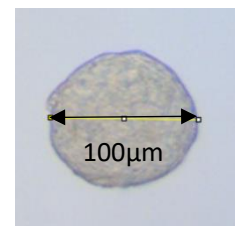


Figure 27 - Sphéroïde de 100 $\mu\text{m}$ .

### b. Compression osmotique à base de dextran

Le dextran est un polymère biocompatible non internalisé par les cellules à la différence d'autres osmolytes (comme par exemple le glucose, ou les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc.)<sup>120</sup>. Le dextran dont le poids moléculaire est de 100kDa ne s'infiltré pas non plus dans l'espace intercellulaire d'un sphéroïde. Il est utilisé pour réaliser un choc osmotique à l'échelle du sphéroïde en évacuant l'eau contenue dans le sphéroïde. Nous pouvons

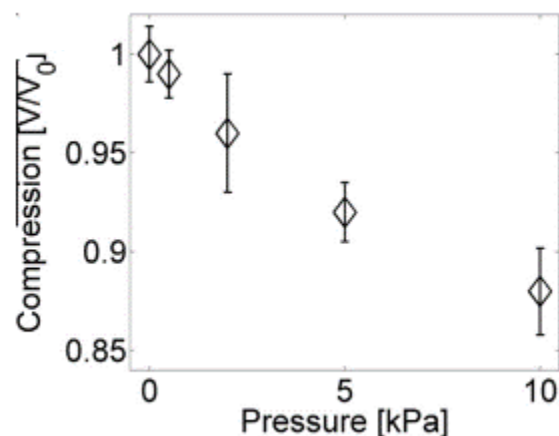


Figure 28 - Image montrant la compression du volume du sphéroïde 5min après le choc osmotique.

observer sur la Figure 28 la diminution du volume du sphéroïde 5 minutes après le choc osmotique pour différentes valeurs de pression.

De plus, l'application de la contrainte est dans ce cas constante contrairement aux osmolytes physiologiques (glucose, NaCl, ou MgCl<sub>2</sub>), dont le gradient de concentration serait progressivement compensé par l'activation des pompes et des canaux ioniques de la cellule ou même par des processus biologiques tel que l'endocytose. Cela permet d'étudier l'impact de la compression osmotique sur plusieurs jours<sup>42</sup>. Les études ont montré que ce type de contrainte réduisait la prolifération cellulaire.

### c. Systèmes de compression mécanique à bases d'hydrogels

Les premiers modèles de compression mécaniques ont été réalisés à 2D : l'effet de la compression est étudié sur une monocouche de cellules. Pour cela, un poids est déposé au-dessus d'une couche cellulaire adhérant sur un substrat<sup>121-122</sup> (voir Figure 29).



Figure 29 - Compression à 2D sur une mono couche de cellules.

Dans notre l'équipe, nous utilisons un coussin d'agarose comme masse contrôlée. La modulation de la compression est assurée en modifiant l'épaisseur ou la concentration en agarose du coussin. Bien que ce type de compression ne reproduise pas l'interaction que possède une cellule avec son micro environnement, il a permis encore récemment de découvrir des voies de signalisation associées à la compression<sup>123</sup>.

A l'aide de moyens expérimentaux similaires, des sphéroïdes ou des micros tissus peuvent être inclus dans un hydrogel pour étudier l'effet des contraintes compressives induites par leur croissance<sup>40,124,125</sup> (voir Figure 30). En se multipliant au sein de la matrice solidifiée, les cellules développent une pression de croissance grandissante.

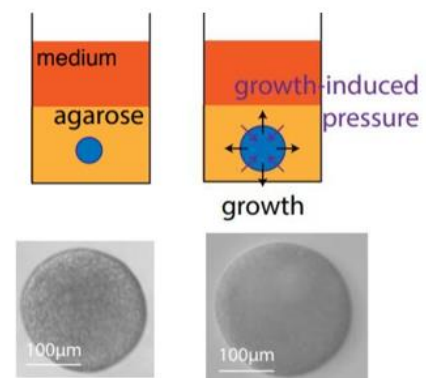


Figure 30 - Schéma montrant le principe d'inclusion de sphéroïde dans de l'agarose. (Rizzuti *et al.*, *Physical Review Letters*, 2020).

C'est en utilisant cette méthode que l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse au LAAS-CNRS (équipe MILE) a montré que les contraintes compressives pouvaient induire une résistance aux drogues classiquement utilisées en chimiothérapie du cancer du pancréas<sup>42</sup>.

Une autre méthode développée par Alessandri *et al.*, permet d'encapsuler des cellules uniques dans des coques en alginate<sup>41</sup>(voir Figure 31). L'une de leurs études montre que les contraintes mécaniques influencent le phénotype des cellules dans un sphéroïde : les cellules les plus mobiles se situent en périphérie du sphéroïde et ont un phénotype semblable aux cellules invasives dans les tumeurs.

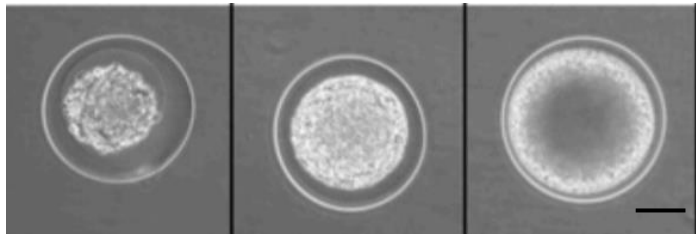


Figure 31 - Encapsulation de sphéroïde dans des coques en alginates (Barre d'échelle : 50 $\mu$ m). (Alessandri *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013)

Les systèmes à base d'hydrogels permettent généralement de lancer des expériences à partir d'un grand nombre d'objets biologiques, ce qui est très avantageux pour mener des études statistiques. Par ailleurs, ils permettent également d'avoir un bon contrôle sur l'environnement chimique lors des expériences. Cependant, l'utilisation de ces systèmes présentent certains inconvénients. Les études sont par exemple limitées à des conditions chimiques statiques, ce qui empêche de réaliser des gradients chimiques ou encore de simuler la présence d'un flux semblable à celui qui s'écoule dans les vaisseaux sanguins. Par ailleurs, il n'est également pas possible de contrôler de façon dynamique les conditions mécaniques dans ces systèmes.

Concernant les systèmes d'inclusion de sphéroïdes dans un hydrogel, la résolution atteinte en imagerie est limitante et ne permet pas de réaliser certaines expériences comme les marquages en immunofluorescence ou encore des mesures micro rhéologiques à l'intérieur de la cellule. Enfin, la récupération de l'échantillon nécessite des traitements chimiques qui peuvent l'altérer.

Des systèmes plus complexes ont alors été mis au point pour reproduire leur rôle<sup>126</sup> : ce sont les tumeurs-sur-puce. Ces dernières sont réalisées à partir de la technologie microfluidique qui permet de réaliser des études en condition dynamique par le biais d'un circuit liquide assurant le transport de substances chimiques au sein d'une tumeur.

#### d. Utilisation de puces microfluidiques pour la compression d'objets biologiques

L'utilisation des tumeurs-sur-puce présente un intérêt majeur puisqu'elles permettent de modéliser des tumeurs à 3D en conditions dynamiques. Elles constituent une approche alternative aux modèles précédents car les études peuvent être réalisées sur des cellules animales dans un environnement *in vitro* d'une composition modulable.

Il existe de nombreuses puces microfluidiques permettant de simuler des contraintes mécaniques de cisaillement ou des contraintes de tension<sup>116,117</sup>. En revanche, il y a peu de systèmes microfluidiques permettant de confiner spatialement des objets biologiques dans le but de reproduire des contraintes mécaniques compressives.

La pression induite par la croissance des cellules est compliquée à étudier. Les méthodes actuelles pour imposer un confinement spatial de cellules animales requièrent l'utilisation de puces semi-ouvertes<sup>127,128</sup> (open-facing device). Cette technologie ne permet pas de confiner entièrement les tissus biologiques car ces derniers peuvent se développer dans la troisième direction, ce qui permet d'atteindre une pression induite par la croissance des cellules de l'ordre du Pa<sup>128</sup>, faible comparée au kPa atteint dans le cas des sphéroïdes inclus dans des hydrogels<sup>42</sup>.

En revanche, un système permettant le confinement spatial (total) de levures a déjà été développé dans notre équipe. Il permet d'étudier la pression induite par la croissance des levures et d'estimer sa valeur en mesurant la déformation des chambres microfluidiques en PDMS (voir Figure 33).

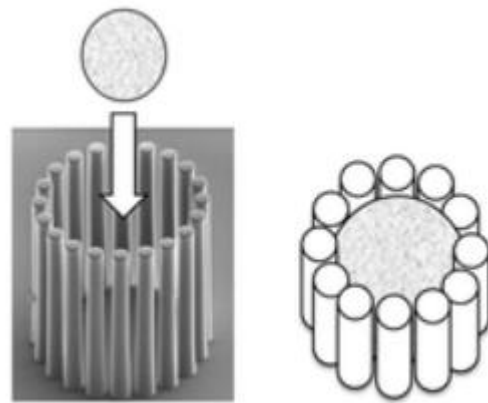


Figure 32 - Schématisation d'un dispositif semi-ouvert constitué de micro-piliers servant au confinement partiel du sphéroïde. (Aoun *et al.*, Lab on a Chip, 2014)



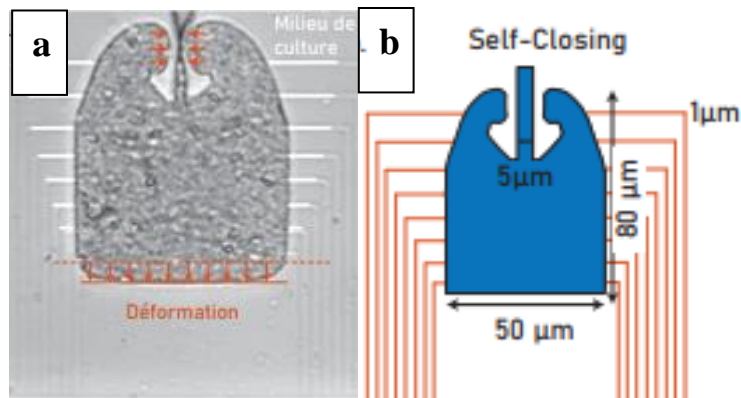


Figure 33 - a. Vue d'une chambre microfluidique permettant le confinement spatial total des levures. b. Schéma de la chambre microfluidique permettant le confinement spatial total.

Ce système a permis de montrer que l'encombrement macromoléculaire augmentait à mesure que la pression induite par la croissance des levures augmentait dans la chambre microfluidique<sup>59</sup>.

La partie la plus importante de ma thèse a justement consisté à développer une nouvelle puce microfluidique pour confiner spatialement des sphéroïdes multicellulaires.

## 5. Comment traite-t-on le cancer ?

---

### a. Les thérapies courantes

Cette partie a pour but de présenter brièvement trois traitements de référence en cancérologie : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les effets secondaires ainsi que les limites des traitements sont différents d'une solution thérapeutique à une autre.

- La chirurgie

La chirurgie est la méthode de traitement du cancer la plus ancienne<sup>129</sup>. Ce traitement est particulièrement efficace lors du début de la progression tumorale. Il consiste à effectuer une opération afin de retirer si possible l'ensemble du tissu cancéreux en prélevant également une partie du tissu sain qui l'entoure pour ne laisser aucune cellule cancéreuse.

Des traitements tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie peuvent être réalisés en amont afin de réduire le volume tumoral avant la phase chirurgicale.

Les conséquences d'un tel traitement sont localisées et se manifestent par la présence de cicatrices.

- La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayons de très hautes énergies pour induire des cassures double brin dans les cellules, avec pour conséquence une mort de ces dernières. Ce traitement s'effectue généralement par voie externe lors de séances quotidiennes. Des implants temporaires ou définitifs peuvent également être administrés.

Il doit être contrôlé avec une extrême précision afin d'engendrer le moins d'effets secondaires possibles. Tout comme la chirurgie, il peut engendrer des conséquences locales au niveau de la zone de traitement tels que des brûlures et ainsi endommager des cellules saines<sup>130</sup>.

- La chimiothérapie

La chimiothérapie est réalisée à partir de médicaments cytostatiques qui permettent de cibler les cellules prolifératrices qui constituent les tissus cancéreux. Leur circulation dans l'ensemble de l'organisme via les vaisseaux sanguins permet d'agir sur la tumeur et les éventuelles cellules cancéreuses ou métastases dissimulées dans d'autres organes.

Ce traitement ne permet pas de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et endommage donc également les cellules saines qui se divisent<sup>131</sup> (cellules présentes à la racine des cheveux, cellules de la paroi intestinale, etc.). Ce traitement s'accompagne de nombreux effets secondaires comme la fatigue, la chute des cheveux, etc. De plus, comme nous l'avons vu, ce traitement peut ne pas fonctionner dans certains cas, lorsque les cellules sont notamment comprimées.

Pour conclure, les thérapies courantes ont fait leur preuve dans certains cancers mais restent limités dans d'autre cas (comme le cancer du pancréas). La recherche de traitements alternatifs en complément ou en relai des traitements standards est un enjeu important dans le domaine de la santé. Récemment, des thérapies plus ciblées voient le jour, permettant de s'attaquer à des voies de signalisation spécifiques à un cancer donné, avec une limitation des effets secondaires. D'autres traitements, comme l'immunothérapie, sont basés sur une stratégie tout à fait différente : ils ne ciblent pas les cellules cancéreuses mais stimulent les défenses immunitaires

afin de lutter contre le cancer. Cette forme de traitement est déjà utilisée de façon standard pour traiter les mélanomes, le cancer du rein, ou encore le cancer de la vessie.

Il existe donc de nombreuses stratégies pour lutter contre le cancer. Dans le cas du cancer du pancréas, il y a un réel besoin de trouver des traitements adaptés. Il faudrait par exemple que l'agent anti-cancéreux ne dépendent pas de l'état prolifératif de la tumeur et soit efficace dans le cas d'une tumeur fortement contrainte mécaniquement, comme tel est le cas pour le cancer du pancréas.

Certaines thérapies, comme les virus oncolytiques combinent plusieurs mécanismes d'action : ils ciblent à la fois les cellules cancéreuses et stimulent également la réponse du système immunitaire contre le cancer. Ce sont des traitements qui semblent très prometteurs mais dont la réponse sous contraintes mécaniques ou la dépendance du traitement au cycle cellulaire n'est pas encore connue. Dans le cadre de ma thèse, nous avons réalisé une étude sur l'effet des contraintes mécaniques (de tension et de compression) sur l'efficacité d'infection d'un virus oncolytique (le virus SG33). Le but de cette partie est donc d'exposer leur potentiel en tant que traitement alternatif dans la lutte contre le cancer.

## b. Les virus oncolytiques : une alternative thérapeutique pour lutter contre le cancer ?

Les virus oncolytiques sont des virus qui infectent et se répliquent préférentiellement dans les cellules cancéreuses, laissant les cellules normales indemnes (voir Figure 34). Ils existent à l'état naturel (non transformés) mais peuvent également être génétiquement modifiés. Leur taille peut varier d'environ 200kilobases (virus de vaccine<sup>132</sup>) à seulement 5kilobases (parvovirus<sup>133</sup>) pour les plus petits virus.

Les virus oncolytiques sont administrés le plus souvent par une injection faite directement à l'intérieur du site tumoral. Cependant, l'administration thérapeutique dépend du type de virus oncolytique utilisé ainsi que du type de cancer. Par exemple, les tumeurs les plus accessibles peuvent être traitées à de multiples reprises dans le temps, tandis que d'autre moins accessibles (comme les tumeurs au cerveau) sont traités une seule fois mais en multipliant les injections dans l'ensemble de la tumeur<sup>134</sup>. Enfin, il est également possible de réaliser une injection intraveineuse pour traiter différents sites tumoraux à la fois.

Les virus oncolytiques peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres thérapies comme la radiothérapie, la chimiothérapie, et l'immunothérapie. Contrairement à

l'immunothérapie qui nécessite d'identifier un antigène tumoral spécifique au patient afin de déclencher la réponse immunitaire, les virus oncolytiques permettent la libération des antigènes tumoraux grâce à la lyse cellulaire, ce qui contribue à recruter le système immunitaire sur le site tumoral<sup>135</sup>.

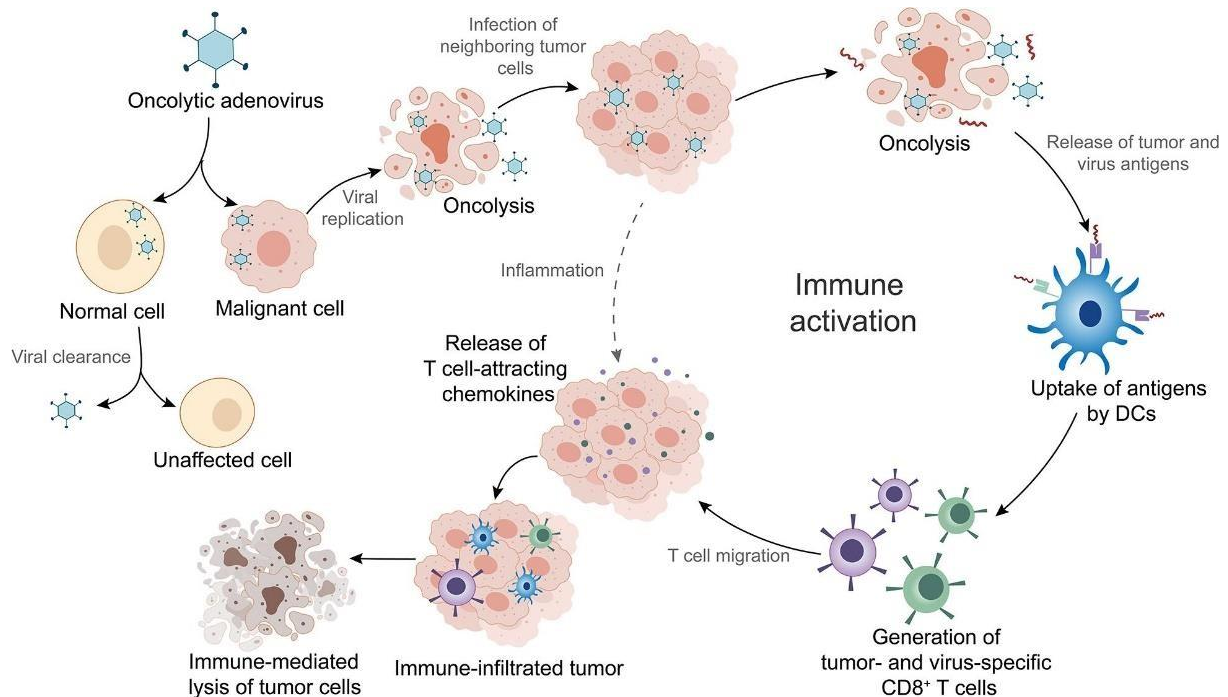
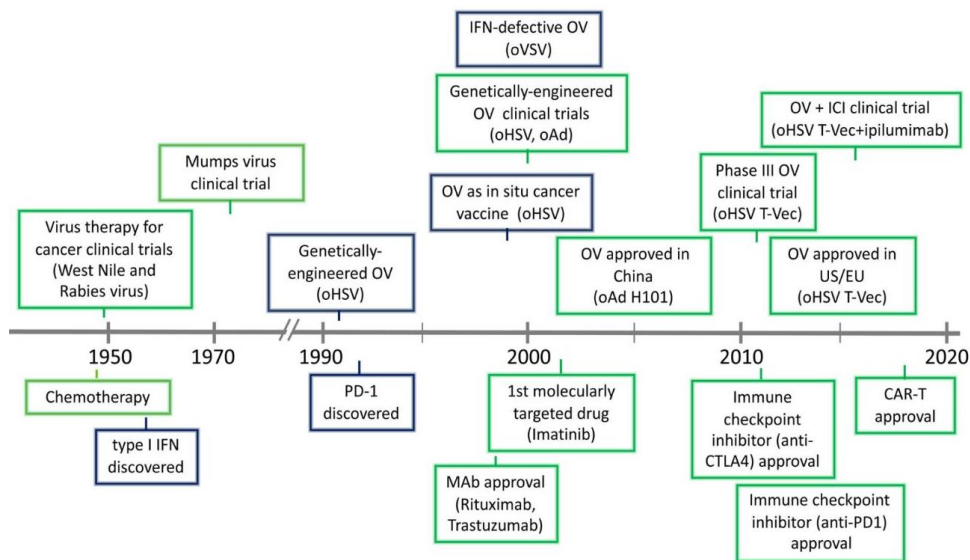


Figure 34 – Le mode d'action sélectif des virus oncolytiques (Zhao *et al.*, 2021).

### c. Contexte de l'utilisation des virus oncolytiques dans la thérapie du cancer

L'utilisation de la thérapie virale pour traiter le cancer n'est pas une idée nouvelle. Elle est le résultat de plusieurs observations qui ont débuté au milieu des années 1880, lorsque des patients atteints de leucémie entraient occasionnellement en rémission après avoir contracté le virus de la grippe<sup>136,137</sup>. Afin de comprendre le potentiel thérapeutique des virus oncolytiques, de nombreuses études précliniques et cliniques ont été menées dans les années 1950 à l'aide de différents types de virus à ARN non atténué de type sauvage (comme par exemple : Bunyamwera (bunyaviridae), dengue (flaviviridae), Ilheus (flaviviridae), etc.)<sup>138</sup>. Dans les années 1990, la technologie de l'ADN recombinant a permis aux scientifiques de réduire les risques liés à la manipulation des virus oncolytiques en créant des virus spécifiquement adaptés au traitement du cancer<sup>139</sup> (voir Figure 35).



**Figure 35 - Chronologie de l'histoire des virus oncolytique et de l'immunothérapie utilisée pour le traitement du cancer (Zhang & Rabkin, 2021)**

Aujourd'hui, cette forme de thérapie attire l'attention après des résultats positifs à de nombreux essais cliniques. Rigvir (traitement du mélanome), Oncorine (traitement du cancer du cerveau) et T-VEC (traitement du mélanome métastatique) sont des exemples de virus oncolytiques qui ont déjà été approuvés au niveau mondial (voir Figure 36). De nombreux autres virus oncolytiques sont encore en cours d'expérimentation. Il s'agit notamment de virus à ADN (adénovirus, virus de l'herpès simplex (HSV), parvovirus et poxvirus tels que le virus de la vaccine (VACV) et le virus du myxome (MYXV)) et de virus à ARN (virus Cocksackie, virus Maraba, virus de la rougeole (MV), etc.)<sup>140</sup>.

Name	Virus Type	Host	Year Approved	Country Approved	Indication	Background
Rigvir (ECHO-7)	Picornavirus	Human	2004	Latvia	Melanoma	Unmodified
Oncorine (H101)	Adenovirus serotype 5	Human	2005	China	Head and neck cancer	Deleted for viral E1B-55K and with four deletions in viral E3
T-VEC (Imlygic)	HSV-1	Human	2015	United States and Europe	Metastatic melanoma	Deletion of ICP34.5 and ICP47; encoding two copies of human GMCSF
DELYTACT (teserpaturev/G47Δ)	HSV-1	Human	2021	Japan	Malignant glioma or any primary brain cancer	Triple mutation (Deletion of ICP34.5, ICP6 and α47 genes)

**Figure 36 - Liste des virus approuvés au niveau mondial. (Rahman & McFadden, 2021)**

## 6. Les principaux mécanismes liés au mode d'action des virus oncolytiques

---

### a. L'infection ciblée des cellules cancéreuses par les virus oncolytiques

Les virus oncolytiques ciblent sélectivement les cellules cancéreuses par le biais de deux stratégies principales. La première stratégie exploite la surexpression de composants extracellulaires dans les cellules cancéreuses, les voies intracellulaires ou les mécanismes d'évitement immunitaire spécifiques à la tumeur (voir Figure 37). La surrégulation des récepteurs des virus oncolytiques à la surface des cellules malignes peut aider à choisir le candidat viral le plus adéquat pour cibler la tumeur correspondante. Par exemple, les molécules CD46 (cluster de différenciation 46), CD155 (cluster de différenciation 155) et l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  sont fréquemment surexprimées dans de nombreux types de cellules tumorales et peuvent servir de récepteurs au virus de la rougeole, au poliovirus et à l'échovirus, respectivement. Dans le cas du virus de la myxomatose (MYXV), un membre des poxvirus oncolytiques, l'entrée n'est pas médiée par des molécules réceptrices sélectives à la surface de la cellule. La liaison du virus est donc possible à la fois pour les cellules normales et cancéreuses. Cependant, la sélectivité du virus est déterminée par l'environnement intracellulaire inné des cellules cancéreuses, qui est moins inhibiteur pour le virus que dans les cellules normales. La deuxième stratégie repose sur la possibilité de produire des virus plus sûrs et plus spécifiques des cellules cancéreuses par génie génétique<sup>140</sup>.

### b. Cycle cellulaire de la cellule hôte et réplication virale

Certains virus oncolytiques ont recours à des stratégies qui consistent à contrôler le cycle cellulaire de la cellule hôte afin d'augmenter l'efficacité de l'infection virale. Voici deux exemples de stratégies complètement différentes parmi les mécanismes déjà découverts :

- La famille des adénovirus nécessite la transcription avancée du gène E1A afin d'initier la réplication virale à l'intérieur de la cellule hôte avant d'induire la mort cellulaire par apoptose<sup>141</sup>. Le produit de ce gène transcrit interagit avec le gène « rétinoblastome », un gène suppresseur de tumeur fréquemment endommagé dans les cellules cancéreuses. Cette interaction permet au virus de provoquer la transition de la cellule de la phase G1

à la phase S et ainsi, de déclencher la réplication virale même dans les cellules quiescentes<sup>142</sup>.

- Le virus de la myxomatose dispose d'une protéine virale appelé M-T5 qui interagit avec la protéine cullin-1, une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire<sup>143</sup>. Cette interaction permet au virus de réguler la transition de la phase G0 vers la phase G1 afin de ne pas entraîner l'arrêt du cycle cellulaire de la cellule hôte<sup>144</sup>. Cela permettrait de protéger les cellules infectées des différentes réponses antivirales innées qui sont normalement déclenchées par un arrêt du cycle cellulaire entre la phase G0 et la phase G1. En revanche, une accumulation des cellules infectées a été observée au niveau du point de contrôle entre la phase G2 et la phase M. Il serait donc intéressant d'observer comment le cycle cellulaire est régulé lors de l'infection des cellules par le virus SG33.

#### c. L'activation du système immunitaire induite par les virus oncolytiques

Après la lyse tumorale, les antigènes associés à la tumeur et les néo-antigènes tumoraux sont libérés et mis à la disposition des cellules dendritiques pour amorcer et stimuler une réponse spécifique des cellules T antitumorales (voir Figure 37). Cela fait des virus oncolytiques une plateforme idéale et naturelle pour recruter des lymphocytes (T CD8+)<sup>145</sup>.

Les virus oncolytiques peuvent également entraîner la libération de motifs moléculaires associés au danger (DAMP), qui favorisent la mort cellulaire immunogène (ICD) (nécrose, nécroptose, pyroptose, mort cellulaire autophagique et apoptose immunogène)<sup>146</sup>. Lorsque les cellules tumorales éclatent, des motifs moléculaires associés aux pathogènes sont également libérés et, avec les DAMP, ils stimulent le système immunitaire inné en interagissant avec les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR)<sup>135</sup>.

#### d. Exploiter la réponse immunitaire préexistante pour améliorer la thérapie oncolytique contre le cancer

Une immunité préexistante contre les composants viraux entraîne une élimination prématurée des virus oncolytique et nuit à leur diffusion systémique, à leur réplication et à l'expression des transgènes. Cependant, il est possible d'améliorer les approches thérapeutiques du cancer en exploitant l'immunité antivirale. Par exemple, les cellules T antivirales peuvent avoir une

réaction croisée avec les antigènes associés à la tumeur homologues aux peptides viraux, participant ainsi activement à l'élimination de la tumeur (voir Figure 37)<sup>147</sup>.

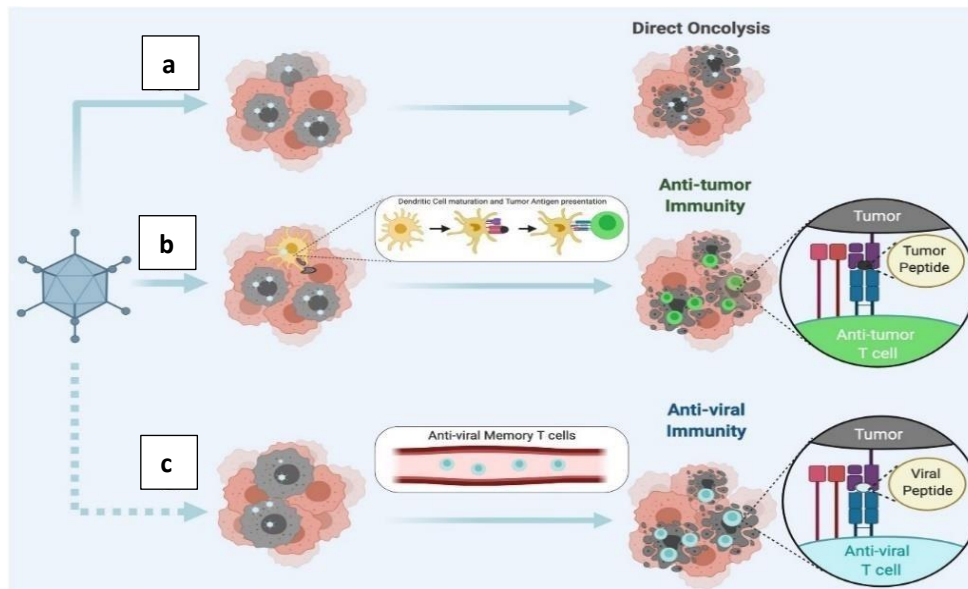


Figure 37 - Les 3 principaux mécanismes d'action des virus oncolytiques exploités dans le traitement du cancer : a. Infection spécifique des cellules cancéreuses. b. Activation de la réponse immunitaire induite par les virus oncolytiques. c. Immunité préexistante antivirale. (Feola *et al.*, 2022).



## 7. Présentation de la problématique

---

Malgré l'importance de ces études, peu de recherches ont été menées sur la compréhension des mécanismes inhérents à la réponse sous compression mécanique, pourtant partie intégrante du développement tumoral. Une des raisons pourrait être le manque de dispositifs permettant un bon contrôle des conditions compressives. Nous commencerons d'abord par présenter le dispositif microfluidique que nous avons mis au point afin de confiner spatialement des sphéroïdes (chapitre 2).

Ensuite, nous aborderons une étude sur la pression de croissance dans un sphéroïde « libre » (sans présence de contraintes mécaniques) et confiné spatialement (dans le dispositif microfluidique). Des simulations sur la pression de croissance d'une cellule dans un sphéroïde (libre et confiné) seront présentées dans le but de comprendre la structuration mécanique d'un sphéroïde. Les résultats des simulations permettront de discuter de l'influence potentielle de la structuration mécanique des sphéroïdes sur la prolifération cellulaire ainsi que l'encombrement macromoléculaire des cellules dans un sphéroïde (chapitre 3).

Enfin, une étude sur les virus oncolytique sera présentée dans le but d'étudier si ce traitement alternatif dans la thérapie du cancer permet de contourner l'inefficacité sous contrainte mécanique de thérapies usuelles. Nous étudierons notamment l'efficacité de ce virus en fonction de différentes contraintes mécaniques (chapitre 4).

## Chapitre 2 : Développement d'une puce microfluidique haut débit pour le confinement de micro-tumeurs

---

A mon arrivée, l'enjeu de mon projet a été de créer une puce microfluidique servant à confiner spatialement des sphéroïdes dans plusieurs chambres en parallèle et de les cultiver pendant plusieurs jours. En s'appuyant sur la technologie « tigarette » (inspirée par des études de l'Institut Curie<sup>148</sup>) développée dans le cadre du projet du Dr. Zacchari Ben Meriem pour ouvrir et fermer des chambres de culture, nous avons créé un nouveau design de puce microfluidique dédié spécialement au confinement spatial des sphéroïdes. Avec l'aide du Dr. Baptiste Alric, nous avons initialement créé une puce comportant des chambres de culture en parallèle en s'inspirant de son dispositif expérimental. Ce dernier sert à confiner des levures et est composée de chambres de culture alimentées de part et d'autre par des canaux d'alimentation très fins qui maintiennent une croissance confinée des cellules. Une fois que les cellules se retrouvent à confluence, elles déforment les chambres de culture en PDMS (voir Figure 38), ce qui permet de calculer la pression induite par la croissance des levures.

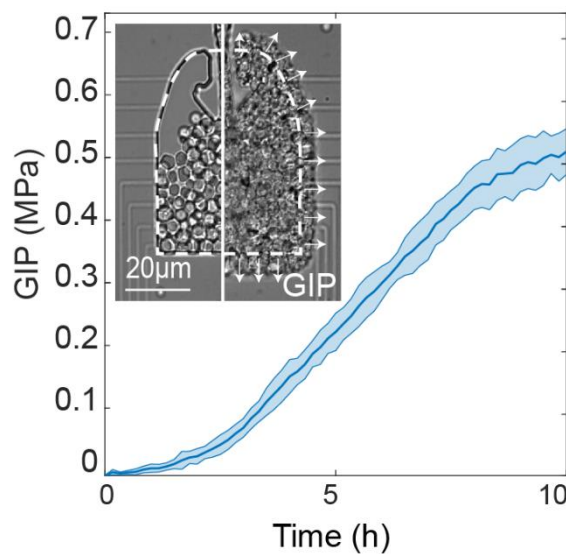


Figure 38 - Courbe de pression développée par des levures confinées dans les chambres de culture. Sur la photo : à gauche levures au début de l'expérience, à droite : levures à forte confluence qui déforment la chambre.

On peut constater sur la figure que les levures atteignent une pression de croissance de plusieurs centaines de kPa tandis que celle développée par des cellules animales dans le cas d'un cancer est 100 fois plus faible (de l'ordre du kPa). Il a donc fallu adapter la stratégie utilisée pour mesurer la pression (chambre déformable) car le module de Young du PDMS (2MPa) est trop rigide pour être déformé par les cellules animales.

## 1. Présentation de la puce

Avant de rentrer dans les détails de microfabrication, une vue de la puce microfluidique est présentée en Figure 39a ainsi qu'une image de l'élément mobile (ou tigette) réalisée au microscope électronique à balayage (MEB).

L'ensemble du dispositif est schématisé en Figure 39b et comprend :

- la puce microfluidique, constituée du canal alimentant les cellules en nutriments ainsi que les chambres de culture disposées en parallèle.
- la tigette ou l'élément mobile (sliding element) qui sert à charger les échantillons puis refermer les chambres de cultures.

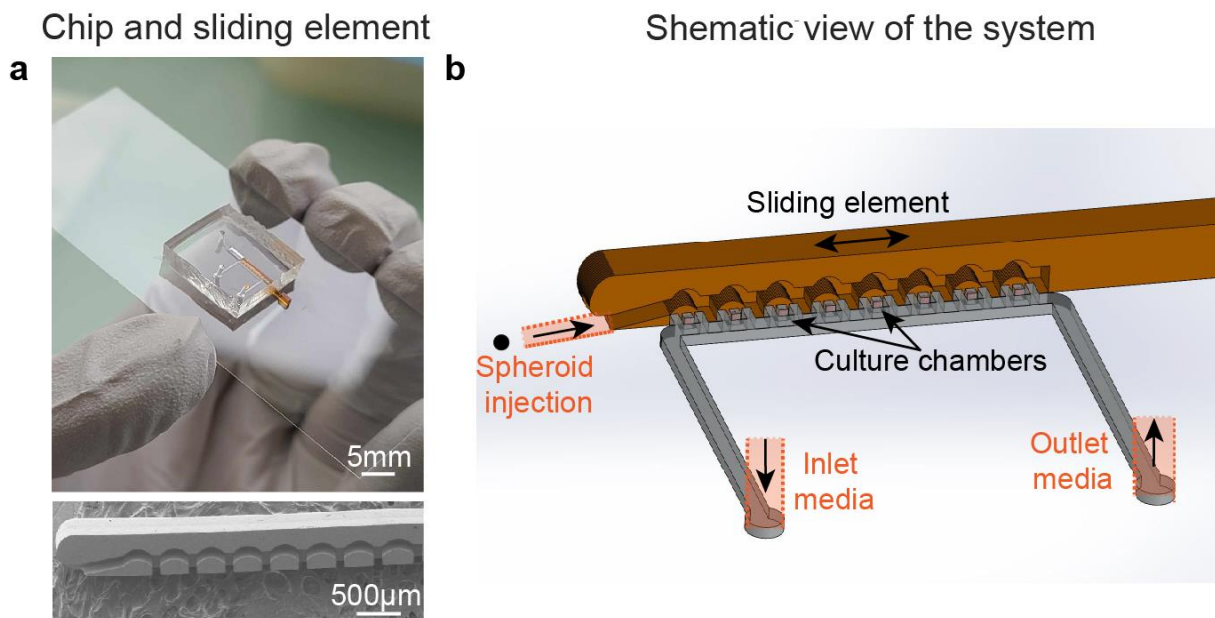


Figure 39 - a. Image du dispositif microfluidique avec la tigette de couleur orange insérée dans la puce et image MEB du côté de la tigette. b. Schéma de la puce microfluidique montrant les différents canaux, les chambres de culture ainsi que la tigette en orange.

Les chambres de culture permettent de cultiver des échantillons de  $100\mu\text{m}$  de diamètre. L'alimentation se fait par diffusion du milieu de culture au travers de micro-canaux ( $2\times 2\mu\text{m}$ ) assurant un confinement total des sphéroïdes.

#### a. Une puce microfluidique à trois niveaux

Ayant vu de nombreux exemples de dispositifs microfluidiques lors de mon master à l'IPGG, j'ai pris conscience rapidement que la microfabrication de ma puce allait être complexe. Celle-ci comprend trois niveaux d'épaisseurs différentes, devant être parfaitement alignés les uns par rapport aux autres pour garantir sa fonctionnalité.

Afin de mieux comprendre l'empilement des différentes épaisseurs qui constituent le moule, voici un schéma détaillé du design ci-contre, réalisé sur le logiciel Clewin. Ce dernier est utilisé pour construire les motifs à 2D du moule avant de les envoyer au service impression de la salle blanche qui gère les commandes de masques.

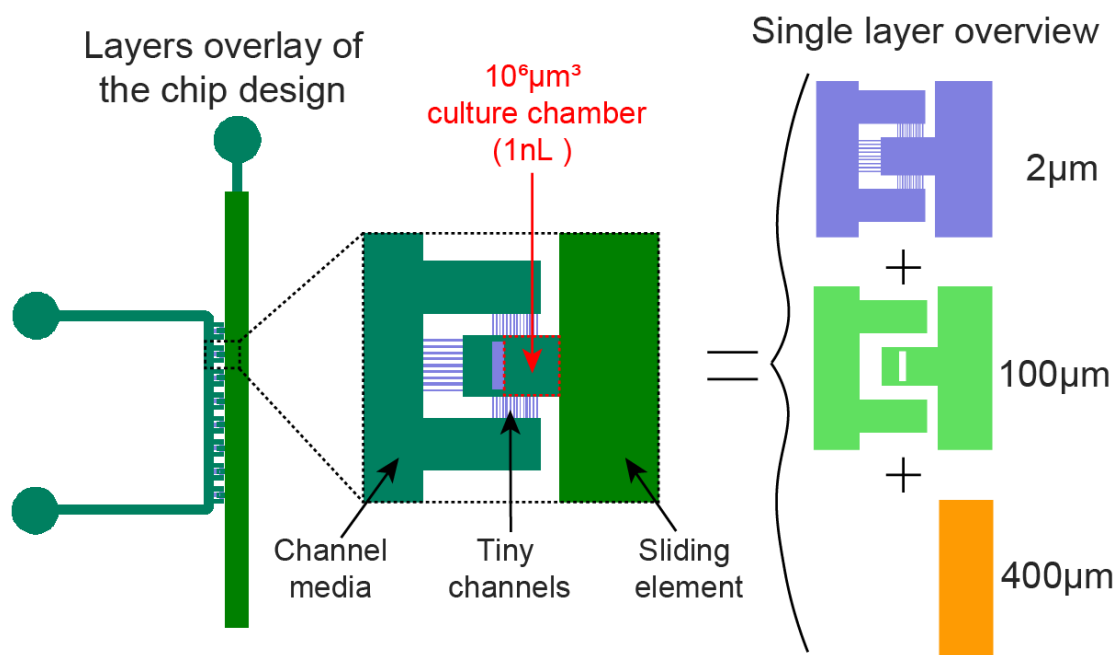


Figure 40 - Schéma détaillé des différentes couches réalisées sur le logiciel Clewin et de leurs motifs.

Le premier niveau possède une épaisseur de  $2\mu\text{m}$  seulement et correspond à des petits canaux d'une section de  $2\times 2\mu\text{m}$  présents de part et d'autre de la chambre de culture. Ils servent à alimenter les cellules tumorales en nutriments et sont suffisamment fins pour qu'elles ne puissent pas s'y introduire. La chambre de culture d'une surface de  $100\times 100\mu\text{m}^2$  ainsi que le

canal permettant l'arrivée du milieu jusqu'au petits canaux précédemment décrits sont d'une épaisseur de  $100\mu\text{m}$ , ce qui correspond au 2<sup>ème</sup> niveau de la puce. Enfin, le troisième niveau correspond au canal central : il est d'une épaisseur de  $400\mu\text{m}$ , permettant d'atteindre une hauteur totale pour ce canal de  $500\mu\text{m}$  et d'insérer la tige de  $500\mu\text{m}$  dans le dispositif.

La réalisation d'un tel moule nécessite la déposition de plusieurs couches de films secs (DF pour dry film) qui sont laminées une à une sur un substrat en silicium – excepté le niveau à  $2\mu\text{m}$  qui a été réalisé à l'aide d'une résine liquide. Les tiges sont également réalisées à partir d'un assemblage de plusieurs couches de DF et sont créées à partir de 2 niveaux d'épaisseurs différentes. Comme pour le moule, une vue des différents niveaux est détaillée en Figure 41. Le premier niveau à  $300\mu\text{m}$  représente la structure « pleine » de la tige, qui garantit sa solidité et le deuxième qui est d'une épaisseur de  $200\mu\text{m}$  comporte le canal dans lesquels les sphéroïdes sont injectés initialement lors du chargement de la puce. Un alignement précis des couches lors de la lithographie est important pour éviter les éventuelles fuites de liquide lors de la fermeture des chambres de culture par exemple. L'ensemble des étapes de fabrication du dispositif sont détaillées dans la suite du manuscrit.

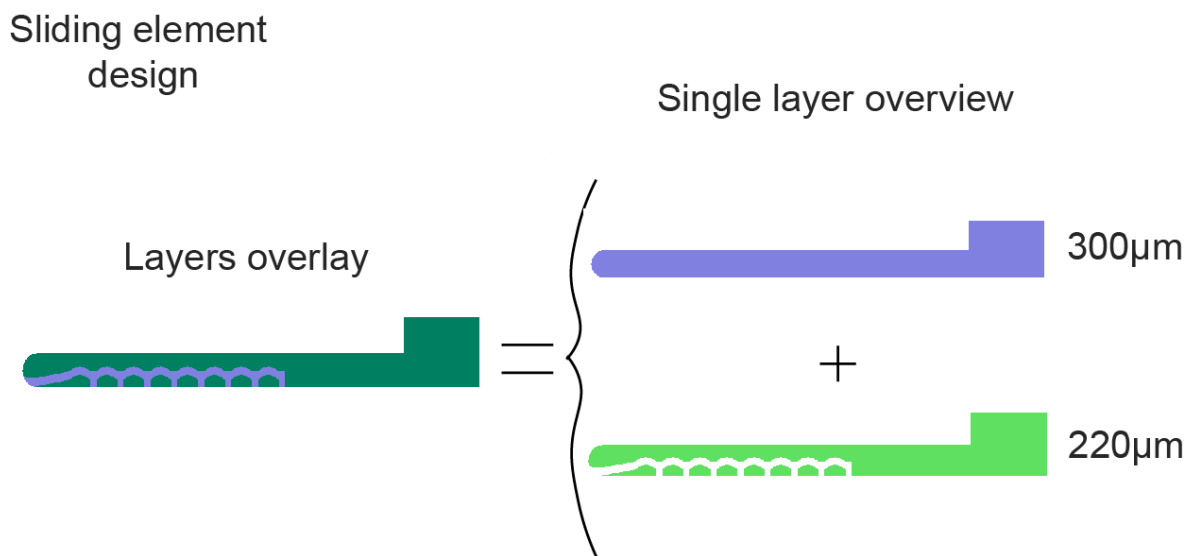


Figure 41 - Design Clewin des deux niveaux constituant la tigellet.

La fabrication des tiges se fait par empilement de couches dans le sens de leurs tranches : la figure présentée ci-contre est donc une vue de côté de la tige. Lorsqu'elles sont insérées dans le dispositif elles sont disposées comme sur le schéma de la Figure 39b précédemment décrite. Par ailleurs, notons qu'il y a une différence de  $20\mu\text{m}$  entre la largeur du canal de la tige et l'épaisseur de la tige elle-même, essentielle pour garantir l'étanchéité du dispositif. Afin de connaître la limite d'étanchéité des tiges, des tests ont été réalisés à partir du dispositif de Zacchari Ben Meriem et sont présentés en annexe 1. En pressurant une entrée de liquide faisant face à une tige, on remarque que le début des fuites a lieu à partir de  $200\text{kPa}$ . Finalement, la fuite n'atteint pas le canal situé derrière la tige mais débute en travers de celle-ci et finit par atteindre les canaux voisins situés du même côté que l'entrée pressurisée. Ceci est dû à l'empilement des couches de films secs de la tige qui font face au canal et qui peuvent présenter des irrégularités au niveau de l'alignement. Pour conclure, la limite d'étanchéité est très haute en regard des conditions utilisées lors de l'expérience. En effet, le flux d'alimentation est faible ( $600\mu\text{L}/\text{min}$ ) et la pression de croissance développée par les cellules ne dépasse pas  $5\text{kPa}$ .

#### b. Un capteur de pression intégré à la chambre

La mesure de la pression de croissance est souvent réalisée grâce à la déformation du milieu environnant les cellules<sup>41,42,40</sup>. Comme nous l'avons vu précédemment, la pression de croissance développée par les cellules animales est trop faible pour déformer directement la chambre dans laquelle elles sont cultivées. Il est donc nécessaire d'intégrer un capteur directement dans la puce pour mesurer la pression de croissance des cellules. Dans la littérature, des micro-piliers microfluidique ont déjà été conçus pour réaliser ce type de mesure<sup>149</sup>. Néanmoins, le pilier étant circulaire, la pression mesurée n'est pas homogène sur l'ensemble de sa surface. De plus, les sphéroïdes s'écoulent comme des fluides très visqueux<sup>150</sup> : s'ils sont confinés partiellement (comme c'est le cas avec la technologie des micro-piliers), ces derniers ne développeront pas une grande pression de croissance car ils s'écouleront entre les piliers. Nous avons donc imaginé une autre méthode pour mesurer la pression de croissance : une membrane déformable de forme rectangulaire, où la pression est appliquée sur l'ensemble de sa surface et donc mieux définie.

Comsol est un logiciel qui nous a permis de réaliser plusieurs modèles de membrane, en amont de la fabrication, pour opter pour la meilleure configuration possible avant de faire les expériences. Pour cela, nous avons utilisé le module de la mécanique du solide en conditions statiques. Une fois que la géométrie de la chambre incluant le capteur a été créé, nous avons choisi du PDMS à 2MPa que l'on a défini comme un matériau élastique linéaire d'un coefficient de poisson de 0,49 et d'une densité de  $970\text{kg/m}^3$  <sup>151,152</sup>. La pression a été appliquée de manière homogène sur l'ensemble de la membrane ainsi que sur les murs de la chambre. En ce qui concerne les autres conditions aux limites, la totalité de la chambre est libre de se déformer. Finalement, un maillage contrôlé par la physique constitué d'éléments tétraédriques a été appliqué sur l'ensemble de la structure. Pour chaque valeur de pression appliqué, le déplacement total est calculé par le logiciel.

Plusieurs configurations de capteur de pression sont possibles et ont donc été modélisés pour déterminer la faisabilité de la mesure :

- Une membrane libre : attachée seulement sur son arête supérieure. Pour cette géométrie, la gamme d'épaisseur mesurée est large : le capteur reste sensible même au-dessus de  $15\mu\text{m}$  d'épaisseur (voir Figure 42a).
- Une membrane qui n'est pas attachée sur son arête inférieure, testée entre 9 et  $11\mu\text{m}$  d'épaisseur. C'est une gamme étroite qui a été choisie car elle est limitée par la résolution que l'on peut atteindre en microfabrication pour les faibles épaisseurs (déjà critique à partir de  $10\mu\text{m}$  d'épaisseur pour  $100\mu\text{m}$  de hauteur, voir Figure 42b).
- Une membrane où toutes les arêtes sont fixées à la puce. Les épaisseurs testées vont de 8 à  $10\mu\text{m}$ . Comme pour la configuration précédente, les possibilités sont restreintes par les contraintes rencontrées en microfabrication. De plus, les résultats des simulations montrent qu'au-dessus de  $10\mu\text{m}$  d'épaisseur, le capteur n'est plus assez sensible (voir Figure 42c).

La représentation des simulations lorsque le sphéroïde exerce une pression allant de 1 à 5kPa, est montrée ci-dessous, sur la Figure 42:

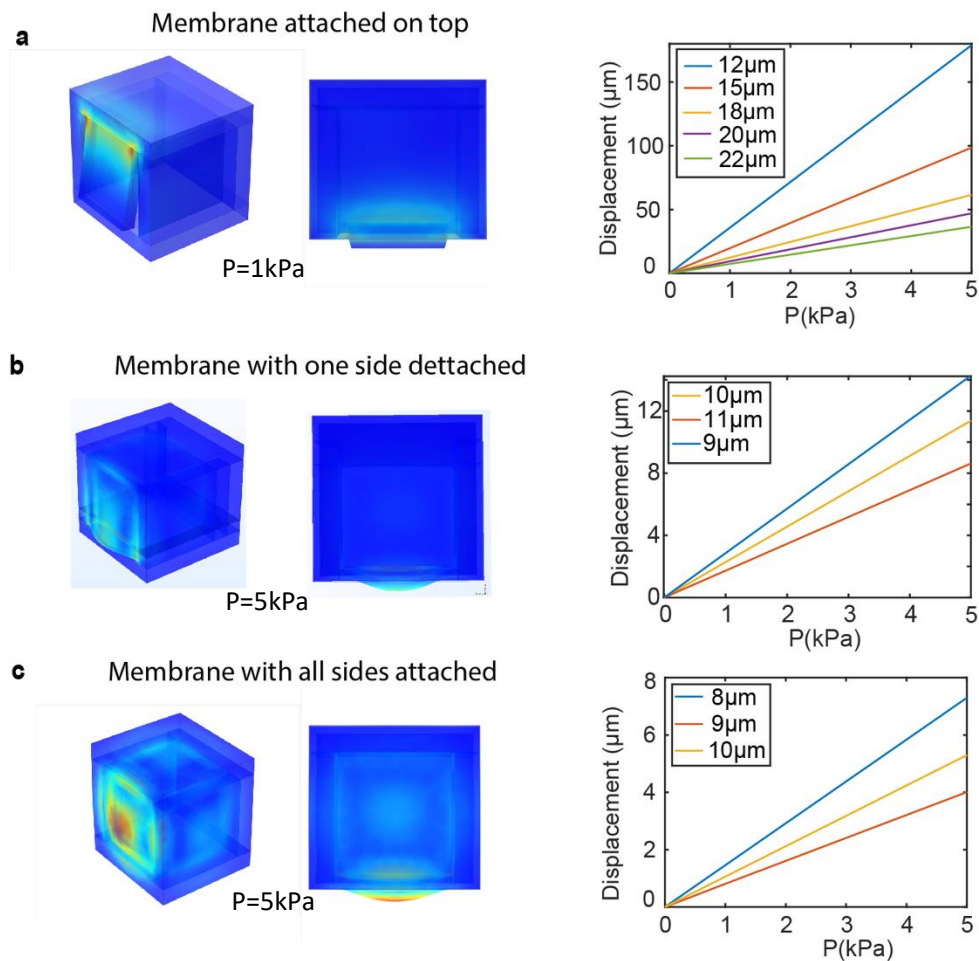


Figure 42 - a. Modélisation d'une membrane "libre" (attachée sur son arête supérieure et représentation de la déformation en fonction de la pression pour des membranes allant de 12 à 22μm. b. Modélisation d'une membrane détachée sur son arête inférieure et représentation de la déformation en fonction de la pression pour des membranes allant de 9 à 11μm. c. Modélisation d'une membrane complètement attachée et représentation de la déformation en fonction de la pression pour des membranes allant de 8 à 10μm.

Pour l'ensemble des configurations, la relation entre la déformation et la pression est de type linéaire. Cela permet par la suite d'établir une courbe de calibration simple pour calculer la valeur de la pression à un instant donné dans la chambre, en fonction de la valeur de déformation mesurée au niveau de la membrane.

Sans surprise, la membrane « libre » est celle qui est la plus déformable puisqu'elle est attachée seulement d'un côté comparé aux deux autres configurations. Les membranes de 18, 20 et 22μm se déforment de 0 à 50μm environ, ce qui permet de mesurer à la fois les faibles et hautes pressions. En revanche, la membrane à 15μm se déforme de 75μm et plus, pour des pressions supérieures à 4kPa. A ces déformations, nous supposons que le sphéroïde pourra passer en dessous de la membrane. Pour la membrane à 12μm, c'est un cas un peu particulier : sa



déformation de  $150\mu\text{m}$  à  $5\text{kPa}$  indique que cette membrane s'est étirée de manière conséquente par rapport à sa taille, elle est donc trop déformable pour réaliser les mesures.

Pour la membrane semi-libre (détachée que sur un côté) les déformations calculées sont relativement inférieures. Pour l'ensemble des épaisseurs, les simulations indiquent une déformation inférieure à  $4\mu\text{m}$  en dessous de  $2\text{kPa}$ . C'est relativement faible et probablement difficile à mesurer, si l'on prend en compte le fait qu'il peut y avoir des changements de focus fréquent si l'objectif  $63\times$  est utilisé avec un maintien de focus malheureusement pas toujours parfait sur des jours d'expérimentation. A des plus hautes pressions, les déformations vont jusqu'à  $14\mu\text{m}$  pour la membrane à  $9\mu\text{m}$ , ce qui est une sensibilité suffisante pour être détectée. Pour résumer, cette membrane sera plus adaptée pour mesurer les plus hautes pressions (supérieures à  $3\text{kPa}$ ) mais sera sensible au bruit pour les valeurs les plus basses.

Enfin, la membrane fixe se déforme très peu : pour l'épaisseur la plus faible, la déformation atteint  $7\mu\text{m}$  au maximum pour une pression de  $5\text{kPa}$ . Il est donc difficile d'envisager son intégration dans le dispositif, en sachant que la microfabrication risque elle aussi d'être complexe.

En conclusion, la membrane « libre » présente la sensibilité la plus grande sur la gamme de pression visée ( $0$  à  $5\text{kPa}$ ) et les déformations semblent faciles à mesurer lors d'une expérience. Par rapport aux deux autres configurations, la microfabrication en salle blanche n'est pas critique car aucune limite de résolution n'est atteinte. C'est donc cette membrane qui a été intégrée dans le design des puces microfluidique.

Afin de calibrer les propriétés mécaniques du PDMS, nous avons modélisé une membrane attachée de toute part pour trouver la relation entre la déformation et la pression pour différents modules d'élasticité (de  $2,6$  à  $3,4\text{MPa}$ ). En relevant la pente pour chaque module de Young, j'ai pu tracer une courbe de calibration représentant la pente en fonction de l'inverse du module. Expérimentalement, j'ai réalisé la même démarche en pressurant la puce à l'aide d'un contrôleur de pression tout en relevant la valeur de la déformation de la membrane. Enfin, en reportant l'indice de la pente trouvé expérimentalement sur la courbe de calibration réalisée à partir des simulations j'ai pu retrouver le module de Young expérimental de la puce. La démarche est présentée en annexe 6.

## 2. Défis technologiques liés à la microfabrication

---

### a. Les premiers développements en salle blanche

Durant ma thèse, j'ai passé beaucoup de temps à fabriquer les moules microfluidiques ainsi que les tiges. Afin de se représenter la durée ainsi que la complexité de l'ensemble du processus, voici le détail des étapes à réaliser en salle blanche pour deux techniques différentes (films secs et résine liquide) :

#### *Fabrication du moule grâce aux films secs*

L'ensemble des étapes est schématisé sur la Figure 43 :

- La phase du design : création du dessin de chaque épaisseur via le logiciel Clewin. Les dessins sont ensuite envoyés au service impression des masques en salle blanche. Le délai pour l'impression dure en moyenne une semaine en fonction de la demande des autres membres du laboratoire. Notons que c'est une chance d'avoir accès à ce service au sein même du laboratoire.
- Lamination : chacune des couches de films sec est laminée sur le wafer avant de procéder à la lithographie à l'aide de la lamineuse Shipley 360. Les épaisseurs de films disponibles étant comprises entre 5 et 100 $\mu\text{m}$ , il faut parfois laminer plusieurs couches de films secs pour fabriquer un même niveau. Par conséquent, le canal de la tige est le plus critique car il faut laminer successivement 4 couches de 100 $\mu\text{m}$  d'épaisseur de films secs sans créer de plis entre les couches. De plus, il faut laisser suffisamment de temps entre chaque lamination pour permettre la relaxation des contraintes liés à la température. Cette étape prend environ 1h.
- La lithographie : elle permet de transférer les dessins présents sur le masque via l'exposition des films secs photosensibles en utilisant la machine MA6 GEN4. Cette étape est elle aussi critique, car l'opérateur doit aligner lui-même le dessin du masque à insoler avec ceux déjà exposés lors des couches précédentes. Le film n'étant pas encore développé à ce stade, les dessins sont peu contrastés et donc difficilement identifiables pour réaliser l'alignement. Plus il y a d'épaisseur entre les deux couches à aligner, moins les motifs de la couche précédente seront visibles. Une difficulté supplémentaire peut s'ajouter si la planéité du wafer n'est pas conservée à l'issue des laminations successives. Cette étape prend environ 1h en moyenne.

- A la fin de chacune des lithographies, un temps de recuit est nécessaire pour éliminer les solvants présents dans le film et figer les motifs précédemment insolés. Il faut compter pour le recuit une trentaine de minutes pour l'ensemble du processus.
- Enfin, le développement consiste à plonger le moule dans un bain de solvant (SU8-developper) et sert à éliminer la résine non polymérisée ainsi qu'à révéler l'ensemble des motifs sur le wafer. Comme la résine est de type « négative » ce sont les parties non insolées qui seront dissoutes. Cette étape dure en moyenne 40min.

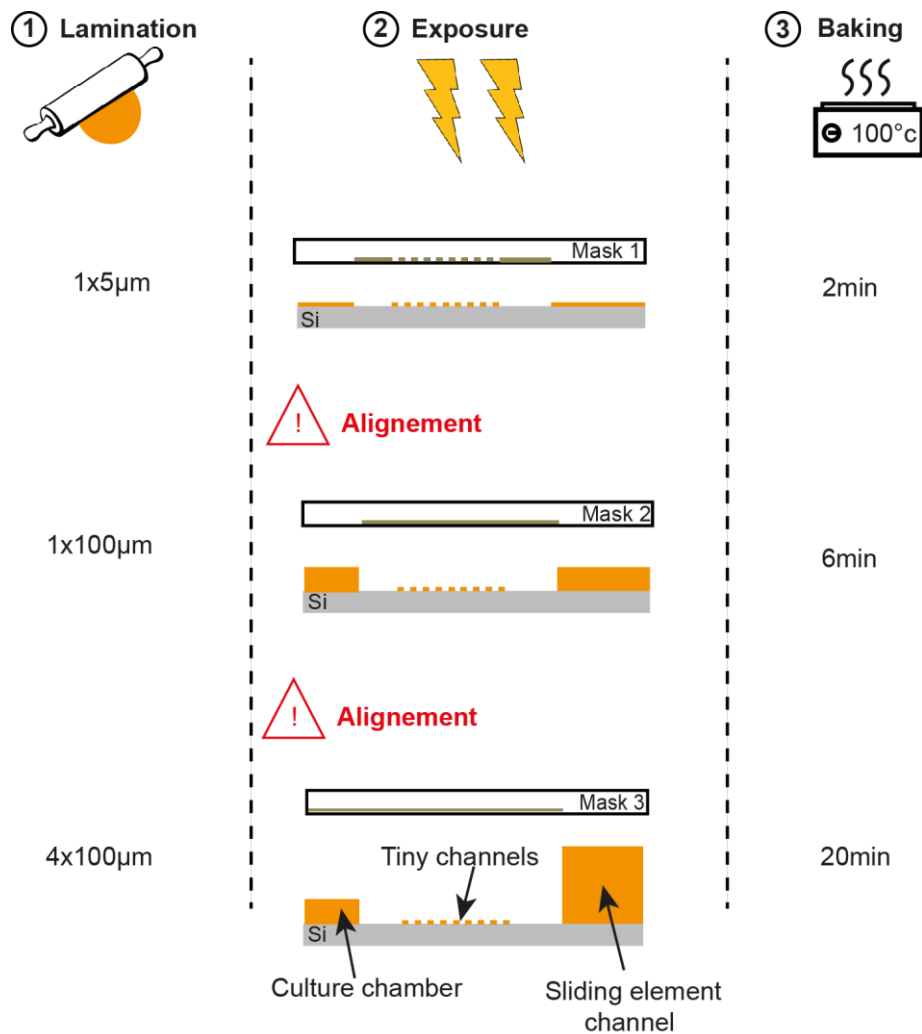


Figure 43 - Procédé de microfabrication du moule à partir des films secs.

## Problèmes de microfabrication

En utilisant la technologie des films secs, j'ai souvent rencontré des problèmes d'alignement suite à un décalage lors de la superposition des différents motifs lors de l'insolation.

Les illustrations sur la Figure 44, réalisées à partir d'images capturées au MEB (S-4800) montrent les problèmes récurrents que j'ai pu rencontrer :

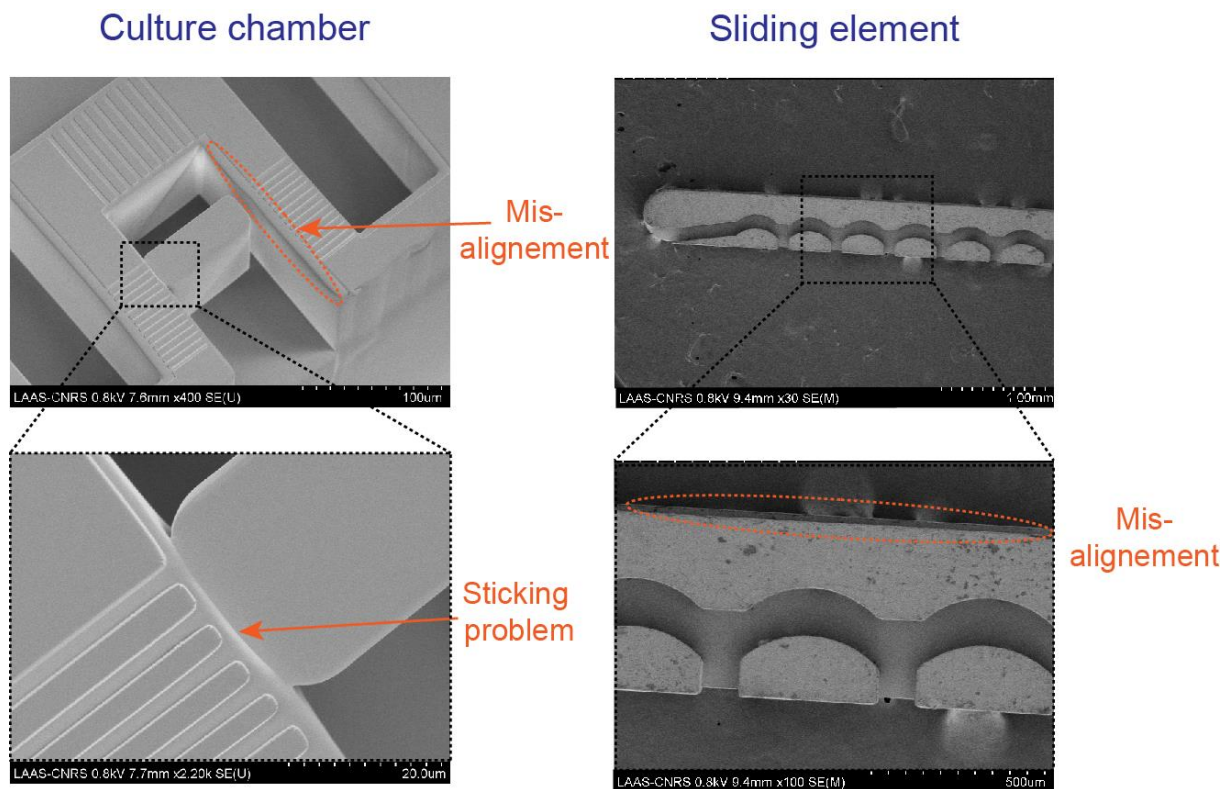


Figure 44 - Illustrations des problèmes de fabrication rencontrés avec les films secs au niveau du moule et de la tige.

- Au niveau de la puce microfluidique, un mauvais alignement entre le niveau à  $5\mu\text{m}$  et celui à  $100\mu\text{m}$  peut engendrer un frottement entre le capteur de pression et le mur de la chambre, allant même jusqu'à le coller/fusionner à ce dernier.
- Pour la tige, un mauvais alignement comme représenté sur l'image de la figure peut causer un problème au niveau du chargement des échantillons dû à une fuite de liquide trop importante. Dans d'autres cas, elle peut aussi engendrer des problèmes d'étanchéité au niveau de la chambre, qui seront à l'origine d'un confinement partiel des sphéroïdes.

De plus, même si les films secs permettent un meilleur contrôle au niveau de l'épaisseur que les résines liquides, la variabilité en hauteur au niveau du canal de la tigette était tout de même de +/-20µm entre chaque batch. Pour pallier ce problème, une grande vigilance a été prise dans la caractérisation de chacun des moules. Comme les tigettes présentaient la même variabilité, un tri en taille a permis d'adapter le choix de la tigette en fonction de la hauteur du canal.

Au cours de ma thèse, il y a eu un problème d'approvisionnement en films secs dû à un changement de coût de la part du fabricant. Le nouveau tarif proposé étant devenu trop cher pour le laboratoire, nous n'avons pas pu faire de nouvelles commandes. Le temps de contacter d'autres fournisseurs, de réaliser des tests avec des films secs de différentes marques et d'adapter le protocole déjà existant, il s'est écoulé environ 8 mois. En attendant les nouveaux films, il a fallu développer un nouveau protocole pour réaliser le moule entièrement en SU8 afin de poursuivre l'optimisation de la puce microfluidique malgré ces imprévus. C'est donc vers Adrian Laborde que je me suis tournée, pour bénéficier de son expertise précieuse en process lithographie.

### *Fabrication du moule en résine SU8*

La résine SU8 est liquide et de type négative : comme le film sec, les zones exposées sont polymérisées à l'inverse des zones non insolées qui seront donc dissoutes lors du développement.

Le principe est le même que pour les films secs, à la différence près que les couches sont déposées sur le wafer à l'aide d'une tournette étend donner que ce type de résine est liquide. Cependant, les temps de recuit sont très longs : il faut compter minimum 1h de recuit entre chaque couche.

- Pour les faibles épaisseurs :

L'avantage des résines liquides par rapport aux films secs, est que l'on puisse contrôler l'épaisseur de la couche en optimisant les paramètres de la tournette, qui sert à déposer la résine sur le wafer. Il existe tout de même différents types de résine SU8, plus ou moins visqueuses, que l'on choisit en fonction de l'épaisseur ciblée. Pour le premier niveau de la puce, nous avons alors voulu passer de 5µm (la plus faible épaisseur disponible en DF) à 2µm car nous nous sommes rendus comptes qu'il y avait quelques cellules qui se déformaient suffisamment pour passer dans les petits canaux d'alimentation. C'est avec un mélange 1:1 de deux types de SU8

(6000.5 et 6005) que nous avons pu atteindre notre objectif. Les paramètres choisis pour la tournette, la lithographie ainsi que le recuit sont précisés en annexe 4.

- Pour le moule entier :

Suite au manque d'approvisionnement en films secs, nous avons testé de réaliser l'ensemble du moule en SU8. Le challenge a donc été de réaliser des couches épaisses de résine, de manière reproductible. Nous avons eu recours à deux solutions différentes :

#### *La tournette à vide*

La tournette Suss Microtec RC8 permet de déposer des couches de résines d'épaisseurs mieux contrôlées qu'une tournette classique. Elle est semi-automatique et le vide créé lors du dépôt maintient une atmosphère saturée en solvant, avec peu de turbulence dû à l'air et une réduction en particules dans la chambre à vide. Cela permet d'utiliser moins de résine, de limiter les contaminations du substrat, d'avoir une rugosité plus faible et d'assurer la planéité du dépôt.

Nous avons d'abord procédé à différents tests en faisant une seule épaisseur à la fois (200 $\mu$ m). Les résultats sont commentés à la suite de l'autre technique décrite ci-dessous, pour les comparer.

#### *L'EVG120*

C'est une machine qui gère de manière automatisée à la fois la dispense de la résine, le recuit, ainsi que le développement. Elle permet le dépôt lent de résine sur le wafer grâce à un dispenseur automatique. Avec cet équipement, les dépôts de plus de 200 $\mu$ m d'épaisseur sont réalisés sur la nuit.

Pour ces deux techniques, nous avons rencontré d'importants problèmes d'homogénéisation sur l'épaisseur du dépôt sur le wafer entraînant une mauvaise répétabilité du protocole. Comme nous ne sommes pas parvenus à réaliser la couche à 200 $\mu$ m de manière homogène, nous ne sommes pas allés plus loin dans la réalisation du moule. Pour avoir une idée des différences d'épaisseurs sur un même dépôt, voici un tableau récapitulatif des valeurs mesurées pour 2 wafers à l'aide des deux techniques précédemment décrites :

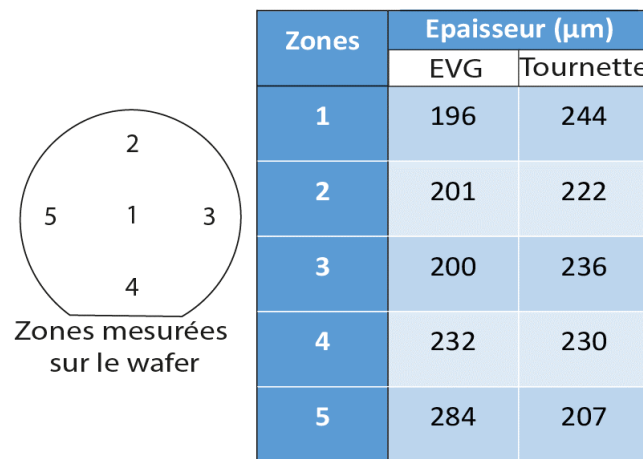


Figure 45 - Exemples de mesures d'épaisseur sur différentes zones d'un même wafer avec le dépôt réalisé avec l'EVG et à la tournette à vide.

Pour l'EVG, on peut voir que les zones 1, 2 et 3 localisées sur le quart en haut à droite du wafer, sont sensiblement homogènes, contrairement aux deux autres zones 4 et 5. Pour la tournette à vide, les valeurs sont moins dispersées mais se rapprochent plutôt de 230μm. Nous n'avons pas réussi à avoir de meilleurs résultats avec ces deux techniques, il a fallu donc trouver une autre solution pour fabriquer le moule.

## b. Optimisation de la microfabrication

### *Fabrication du moule par impression 3D (Nanoscribe)*

C'est en parlant de mes problèmes de microfabrication à d'autres membres du laboratoire que l'on m'a dirigé vers Pierre-François Calmon, qui est en charge de l'équipement Nanoscribe (modèle Photonic Professional).

Cette machine permet de fabriquer des objets allant de la dizaine de nanomètres à 700μm. C'est un procédé basé sur la polymérisation bi-photon qui permet l'impression 3D d'objets en haute résolution. La machine permet de faire du prototypage et donc de changer aisément le design à chaque nouvelle fabrication. En effet, le dessin du moule est réalisé en 3D, cette fois à l'aide du logiciel Solidworks et peut être imprimé en une quinzaine d'heures sur la machine. Jusqu'ici, cet équipement n'avait jamais été utilisé pour réaliser des moules microfluidiques, nous avons donc entrepris plusieurs tests afin de trouver les bons paramètres d'impression.

Après avoir terminé le dessin du moule sur Solidworks, le design est transféré vers un logiciel du Nanoscribe. Sur ce dernier, nous avons défini l'utilisation de la résine IP-S, une résine négative très visqueuse dont la composition est proche de la SU8. Elle est utilisée de pair avec

l'objectif 25x, qui permet de réaliser des structures millimétriques, idéale donc pour l'impression d'un moule microfluidique. La structure du moule est illuminée bloc par bloc, nous avons donc défini leurs tailles : environ 250x270 $\mu\text{m}$  pour 100 $\mu\text{m}$  de hauteur. Puis nous avons pris soin de les positionner de manière à ce que chacune des chambres de culture corresponde à un seul bloc, pour éviter des erreurs de raccords plus critiques à cet endroit du moule. Nous avons choisi d'utiliser des blocs « creux » structurés par des éléments tétraédriques, pour réduire (drastiquement) le temps d'impression. En contrepartie, pour renforcer la solidité du moule, nous avons épaissi la coque des blocs et paramétré un recouvrement de 1 $\mu\text{m}$  pour éviter une éventuelle délamination.

Une fois que la nouvelle structure est éditée, nous pouvons choisir les paramètres de base de l'impression (vitesse et intensité du laser). Un autre élément particulièrement critique à paramétrer est l'interface du moule. Nous avons rencontré deux problèmes liés à ce paramètre : un détachement du moule sur le wafer ainsi qu'une épaisseur non homogène le long du canal tigette. Pour éviter le détachement du moule, nous avons paramétré la recherche d'interface à 2 $\mu\text{m}$  en dessous de l'interface trouvée par le laser. Ensuite, pour avoir une épaisseur mieux définie sur l'ensemble du moule, nous avons programmé une vingtaine de recherche d'interfaces lors de l'impression.

Le développement est quant à lui assez critique (à la dizaine de seconde près) et nous avons rencontré de nombreux problèmes d'adhérence ou au contraire de sous-développement lors de la phase d'optimisation du protocole. La Figure 46a représente une photo du moule avant optimisation des paramètres d'impression : le canal de la tigette s'est détaché et l'auréole blanche autour des motifs indique la présence de résine non-polymérisée sur le moule, dû à un développement trop court. Le problème d'adhérence survient lorsque l'on démoule le PDMS du moule : le canal tigette étant très épais, il y a beaucoup de contraintes à son niveau lorsque l'on retire le PDMS. J'ai pu constater que la tigette ne s'arrachait jamais en premier du côté où elle est reliée à une entrée liquide d'une épaisseur plus faible (100 $\mu\text{m}$ ), j'ai donc décidé d'ajouter un rebord de 100 $\mu\text{m}$  du côté opposé, accolé à la tigette pour faciliter le démoulage (voir Figure 46b). En optimisant les paramètres d'impression, j'ai pu obtenir une bonne adhérence du moule (Figure 46c) ainsi que des chambres de culture sans aucun défaut d'alignement (Figure 46d).



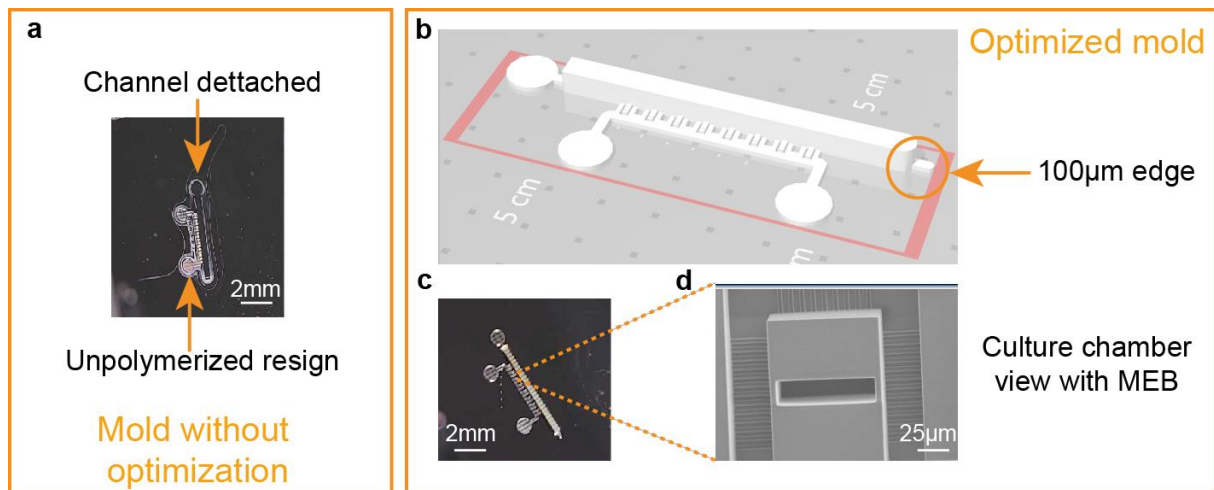


Figure 46 - a. Vue du moule non optimisé avec le canal tigestte détaché et des traces blanches de résines non-polymérisées. b. Vue du dessin du moule avec ajout d'un rebord à 100µm d'épaisseur sur l'une des extrémités de la tigestte. c. Vue du moule après optimisation des paramètres d'impression. d. Vue MEB de la chambre.

En photo-polymérisant le moule en une seule étape, nous avons directement obtenu un meilleur alignement des géométries tout en améliorant également le respect des côtes du dessin.

Par rapport aux inconvénients liés à cette technique d'impression, on perd la possibilité de fabriquer collectivement les moules microfluidiques sur un même wafer. Cependant, il est également possible de développer un protocole pour fabriquer des moules en PDMS à partir du moule réalisé au Nanoscribe afin de pouvoir fabriquer plusieurs puces en même temps<sup>153</sup>.

#### *Fabrication des tigesttes avec une machine de gravure du verre (Femtika)*

Les tigesttes nécessitent un seul alignement lors de leur fabrication, mais celui-ci doit être réalisé au micron près pour charger sans difficulté les échantillons et s'affranchir des éventuelles fuites de liquide après fermeture des chambres de culture.

C'est avec David Bourrier que j'ai pu découvrir la gravure du verre, que nous avons utilisée pour réaliser les tigesttes sans défaut d'alignement. Nous avons d'abord réalisé des commandes auprès de la société Femtika puis nous avons pu acheter la machine qui est arrivée (malheureusement) assez tardivement par rapport à la fin de mon contrat (fin août 2023). Néanmoins, nous avons quand même pu valider la réalisation des tigesttes avec cette machine.

Cet équipement permet la gravure d'objets sur verre. C'est un avantage considérable par rapport aux films secs : il n'y a aucune auto-fluorescence due au matériau lors des expériences en microscopie (voir annexe 2).

Cette technologie consiste en deux étapes de fabrication : une irradiation au laser femtoseconde et une gravure chimique ultérieure. Le laser de la machine crée des modifications du verre (nano-fractures) qui sont ensuite gravées au KOH. Ce laser hautement focalisé permet la fabrication d'objets 3D de forme complexe avec une précision micrométrique.

Comme pour le Nanoscribe, la conception des designs en 3D est préalablement réalisée sur le logiciel Solidworks. Cela permet de faire du prototypage rapide en changeant le design de l'objet à chaque itération. L'écriture laser est rapide, il faut compter environ 1h pour l'écriture d'une tigelette. En revanche, le développement est plus long et dépend de l'épaisseur du substrat en verre utilisé. Cette étape a par exemple nécessité une dizaine d'heures pour les tests présentés par la suite.

Cette machine permet de structurer des canaux dans les tigelettes dans plusieurs directions de l'espace. Nous avons réalisé quelques tests sur les tigelettes, comme par exemple une matrice de canaux très fins qui sont présents sur la zone de la tigelette qui permet de refermer la chambre de culture (voir Figure 47).

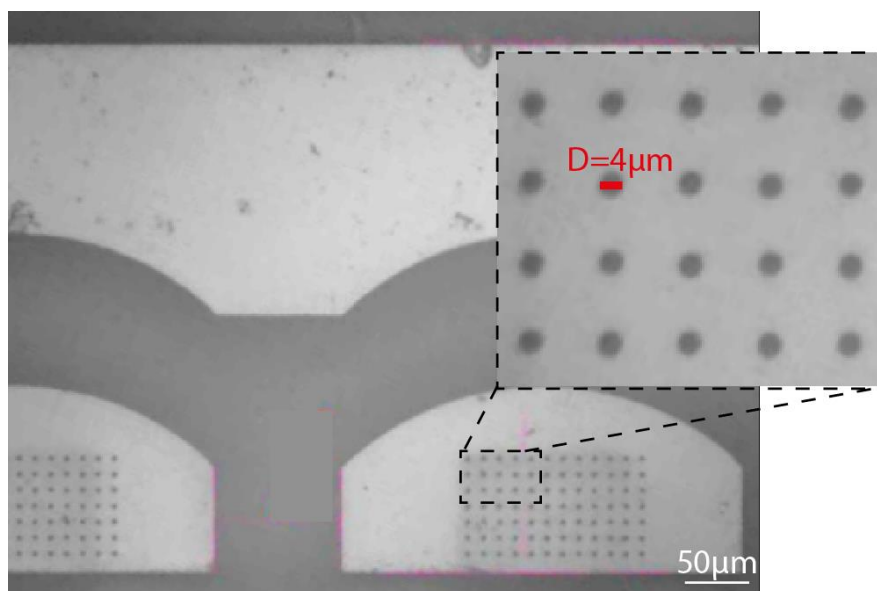


Figure 47 - Image d'une des tigelettes en verre comportant des matrices de canaux fins ( $4\mu\text{m}$  de diamètre sur  $100\mu\text{m}$  de longueur).

Le but de ces canaux est de permettre la circulation du milieu de culture sur toute la hauteur de la chambre de culture afin d'homogénéiser l'alimentation qui est jusqu'ici faite uniquement au niveau du dessous de la chambre de culture.

### 3. Utilisation du dispositif

#### a. Chargement des échantillons

La première étape consiste à injecter du liquide dans le canal central pour pouvoir insérer la tige dans la puce. Après avoir mis la puce entièrement sous liquide, les éventuelles bulles d'air sont chassées en pressurant la puce (injection de liquide via une entrée et fermeture de toutes les sorties). Les sphéroïdes sont préalablement formés grâce à la méthode de la goutte pendante (voir annexe 5) et sont prélevés un à un dans un tube connecté à une seringue. Ils sont ensuite introduits via l'entrée de liquide connectée à l'extrémité de la tige.

Une fois qu'ils sont à l'intérieur de la tige, les sphéroïdes parcourent un canal présentant une succession de creux et de bosses.

Lorsqu'un sphéroïde arrive au niveau d'un creux et que le flux de liquide est coupé, il sédimente en quelques secondes au fond de celui-ci (voir Figure 48, étape 1). Ensuite, le flux de liquide est à nouveau actionné et le sphéroïde se dirige vers la chambre de culture car le liquide peut s'évacuer uniquement au travers des petits canaux présents dans les chambres et que les bosses de la tige de part et d'autre du sphéroïde sont suffisamment grandes pour empêcher sa recirculation à l'intérieur

de celle-ci une fois qu'il a sédimenté. Lorsque les sphéroïdes sont localisés dans les chambres de culture, la tige est déplacée pour refermer ces chambres (Figure 48, étape 2).

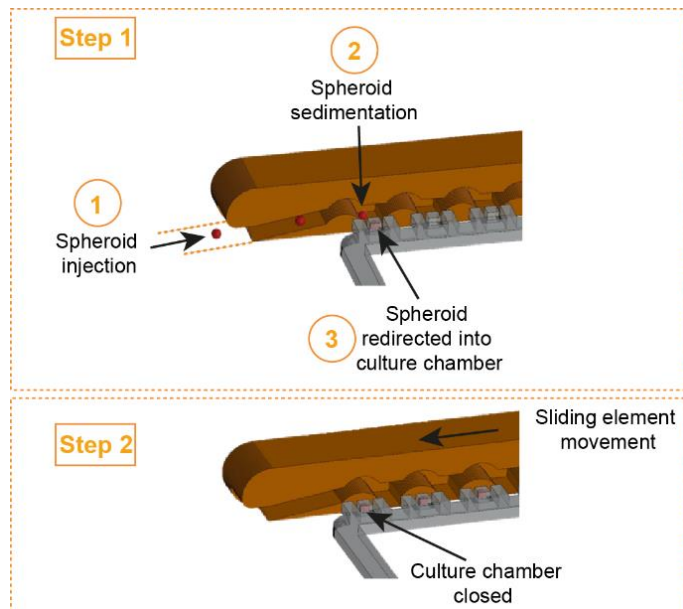


Figure 48 - Chargement des échantillons en deux étapes : 1. Injection, sédimentation puis positionnement des sphéroïdes dans les chambres. 2. Déplacement de la tige pour refermer les chambres de culture.

Des images du chargement des sphéroïdes dans le dispositif sont présentés sur la Figure 49. On peut y voir un sphéroïde déjà localisé dans une des chambres de culture ainsi qu'un nouveau sphéroïde étant sur le point d'entrer dans le canal de la tigelette (image a). Puis, on peut voir la sédimentation du nouveau sphéroïde dans un creux de la tigelette (image b) et enfin sa présence dans la chambre de culture (image c). Sur la Figure 49d, on peut voir que l'ensemble des sphéroïdes sont confinés dans les chambres de culture et que l'expérience peut être lancée.

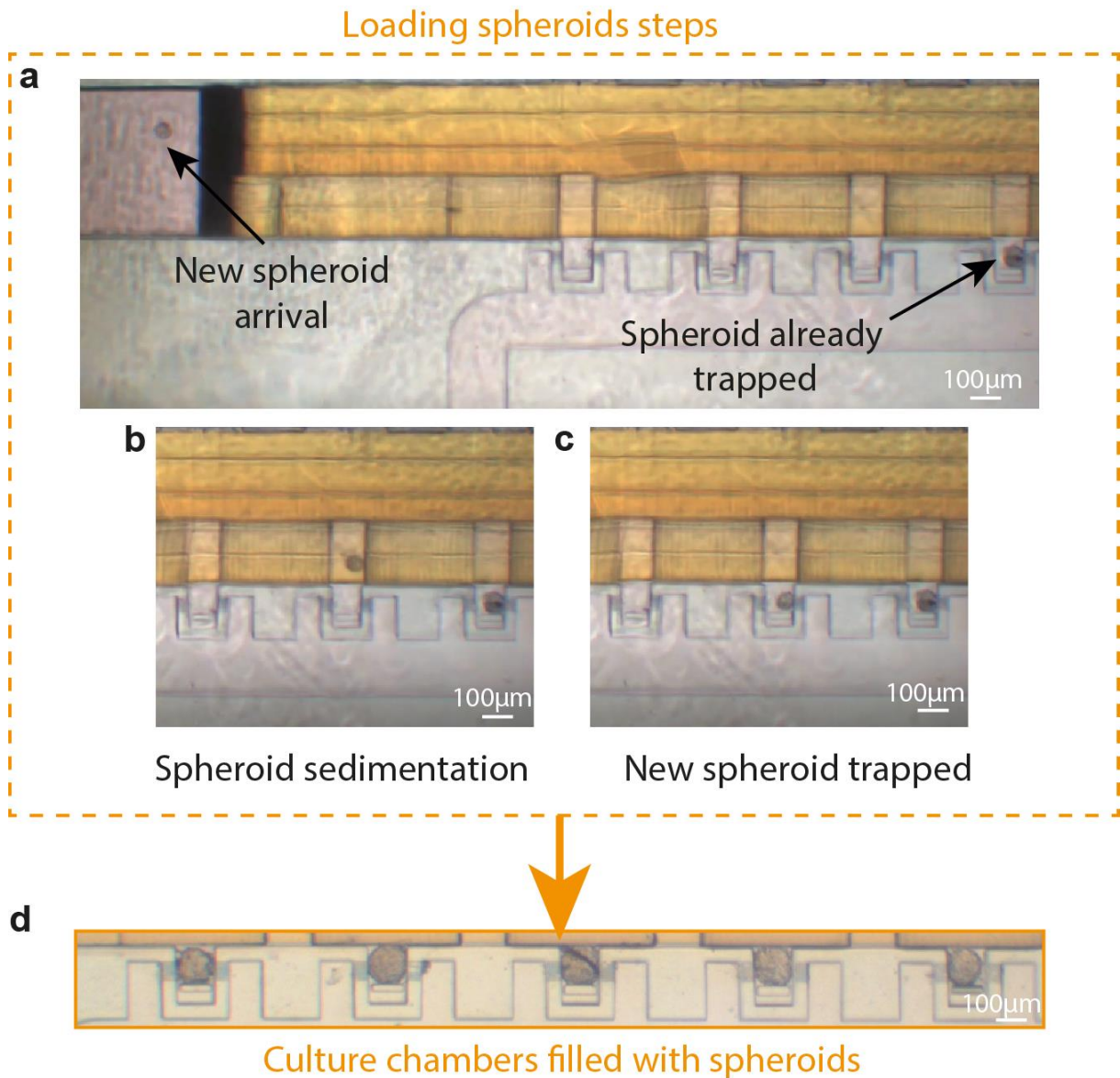


Figure 49 - Images des différentes étapes permettant le chargement des sphéroïdes dans la puce microfluidique : (a) arrivée d'un nouveau sphéroïde dans le canal de la tigelette, (b) sédimentation du sphéroïde dans un « creux » de la tigelette, (c) sphéroïde localisé dans une des chambres de culture. d. Image des sphéroïdes confinés dans les chambres de culture.

Notez que ces étapes peuvent être réalisées en sens inverse, ce qui permet de récupérer les sphéroïdes en fin d'expérience, pour mener d'autres types d'analyses biologiques (voir partie (d) dans la suite du manuscrit).

## b. Preuve de concept

Afin de vérifier que les sphéroïdes ont une alimentation optimale dans la puce microfluidique, nous avons comparé la croissance d'un sphéroïde « contrôle » cultivé librement dans un puit sur coussin d'agarose avec un sphéroïde « contrôle » cultivé directement dans la puce microfluidique.

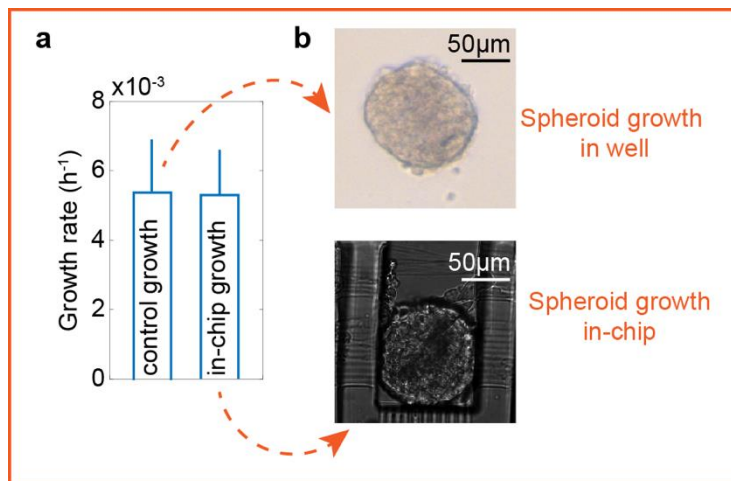


Figure 50 - Taux de croissance mesuré dans le cas d'un sphéroïde cultivé dans un puit et dans le cas d'un sphéroïde cultivé dans une chambre contrôle de la puce.

La puce dispose de deux chambres de culture de même taille que les autres mais qui ne disposent pas de clapet. Les sphéroïdes ont donc la place de se développer librement dans une direction de l'espace malgré le fait qu'ils soient confinés dans l'autre direction par la hauteur et la largeur de la chambre. Ces deux chambres nous servent de « contrôle » car les échantillons sont cultivés sans confinement total.

Nous pouvons observer sur la Figure 50 que les taux de croissance sont comparables dans les deux conditions (environ  $5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

Par ailleurs, notons que le confinement partiel des sphéroïdes contrôles s'apparente à celui que l'on retrouve dans les dispositifs semi-ouverts<sup>154</sup>. Les résultats ci-contre permettent de justifier la nécessité d'un confinement total, comme dans les autres chambres de culture de la puce microfluidique qui ne sont pas des chambres « contrôles », car un confinement partiel ne limite aucunement la croissance des sphéroïdes et ne permet pas l'émergence d'une pression induite par la croissance.

### c. Mesure de la pression de croissance

Les expériences de microfluidique peuvent durer jusqu'à 4 jours. Une acquisition en lumière blanche est lancée toutes les 10 minutes ou toutes les heures pour observer les variations du capteur. Il a fallu donc développer un code Matlab pour automatiser l'analyse, ce qui a été réalisé en majeure partie par Dr. Morgan Delarue. Les images sont d'abord traitées sur imageJ en corrigeant les éventuels décalages en x-y puis la suite d'image est rognée de manière à avoir uniquement les variations de la membrane (voir Figure 51 passage de l'image en (a) à l'image en (b)). Ensuite la séquence d'image est transférée dans le programme Matlab pour lancer l'analyse.

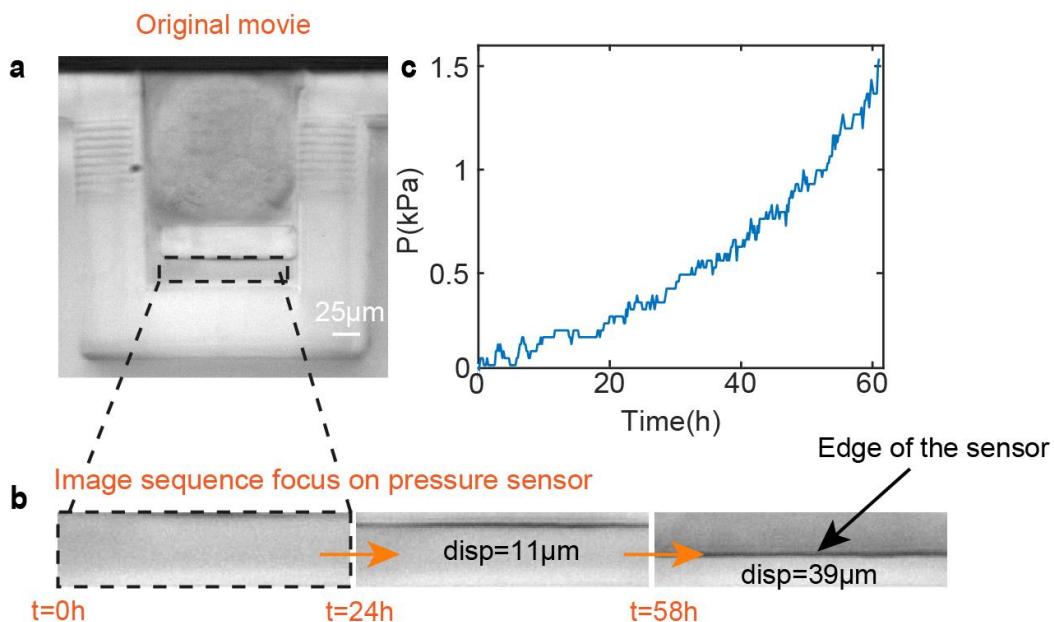


Figure 51. a. Exemple d'une image tirée d'une expérience. b. Séquence d'image entrée dans le code, focus sur le capteur de pression. c. Courbe de pression calculée par le code Matlab.

Comme le bord du capteur est délimité par une bordure très contrastée (voir Figure 51b), nous avons utilisé une méthode de détection de bord pour calculer la déformation de la membrane (programme donné en annexe 3).

Dans un premier temps, le code permet d'afficher le graphique présentant la déformation de la membrane en fonction du temps. Le temps est calculé à partir de la fréquence d'acquisition entrée en paramètre ainsi que le nombre d'image de la séquence donnée. En entrant également le coefficient directeur de la courbe de calibration (linéaire) obtenu entre la déformation et la

pression lors des simulations sur Comsol, le code affiche finalement la courbe de la pression de croissance (voir Figure 51c).

Ce programme s'est révélé robuste sur les analyses faites à partir de films réalisés à l'objectif 20x. Cependant au 63x, le niveau de détail est parfois trop important et des erreurs de détection peuvent avoir lieu sur des changements de contraste ayant lieu autour de la membrane.

### *Courbes de pression de croissance*

Les courbes de pression obtenues avec la membrane de type « libre » pour différentes largeurs (15, 20 et 25 $\mu\text{m}$ ) sont présentées sur la Figure 52b. Elles ont été obtenues à partir de la lignée de cancer du pancréas A338 (voir spécifications sur l'annexe 10). Chacune des courbes représente l'évolution de la pression de croissance pour un sphéroïde dans la puce mesurée à partir de la déformation du capteur de pression (voir Figure 52a).

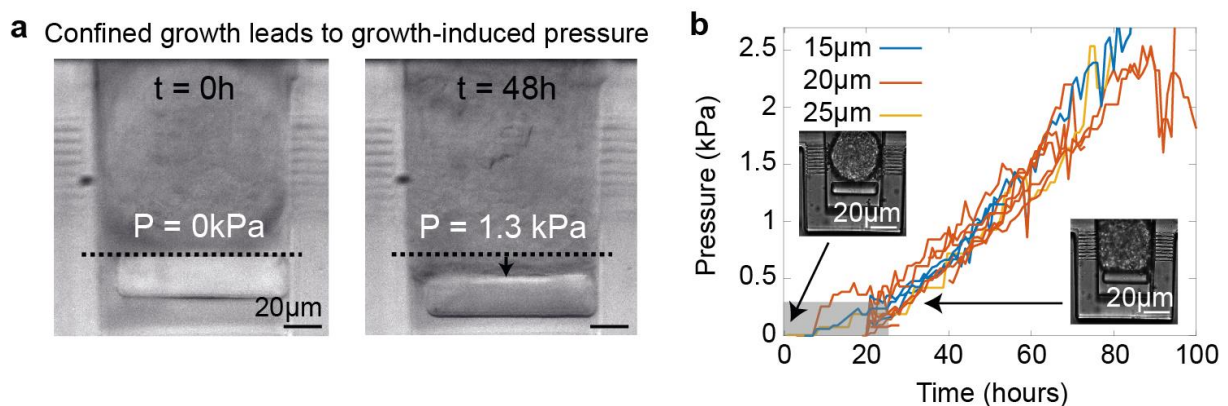


Figure 52 - a. Observation et mesure de la déformation du capteur de pression entre 0 et 48h. b. Présentation des courbes de pression de croissance mesurées dans le cas d'une membrane libre allant de 15 à 25 $\mu\text{m}$ . (Cellules : A338)

### *Définition du zéro*

Lorsque les expériences sont lancées, les éventuelles différences de tailles entre les sphéroïdes peuvent induire un décalage temporel de la courbe de pression de croissance. Afin de pouvoir comparer les courbes de pression d'une chambre à l'autre, nous avons dû définir un nouveau zéro (en temps) pour l'ensemble des courbes.

Nous l'avons défini comme étant l'heure à laquelle le sphéroïde occupe l'ensemble de la chambre de culture, marquant le début de la confluence dans la chambre (voir photo sur la Figure 52b).

### *Les 24 premières heures*

Lorsque le sphéroïde n'est pas entièrement en contact avec la membrane, il est nécessaire d'appliquer un facteur de correction pour obtenir la valeur de la pression. Compte tenu des conditions d'imagerie, la détermination de ce facteur n'est pas facile, car nous ne sommes pas en mesure d'observer assez finement la zone de contact entre le sphéroïde et la membrane. Lors des simulations, la pression étant appliquée sur l'ensemble de la surface de la membrane, nous avons sous-estimé cette dernière lors des expériences. Le carré grisé sur la Figure 52b indique les valeurs pour lesquelles la pression a été sous-estimée, c'est-à-dire en dessous de 250Pa. Le travail sur le facteur de correction est montré sur l'annexe 9.

Notons également que pendant cet intervalle de temps, le sphéroïde se déforme en passant d'une forme sphérique à une forme cubique pour des pressions avoisinant 250Pa. Cette pression correspond à la pression à appliquer pour déformer le sphéroïde, luttant contre la tension de surface qui tend à le maintenir sphérique. A l'aide de Sylvain Landiech, nous avons pu estimer l'ordre de grandeur de la tension de surface des A338 en trouvant une valeur de 1,5nN/μm. Cela est cohérent avec les mesures trouvées pour d'autres lignées cellulaires avec la méthode classique d'aspiration par micro-pipette<sup>155</sup>. Le détail des calculs est donné en annexe 8.

### *Suite de la courbe de pression*

Nous pouvons voir que la pression induite par la croissance des sphéroïdes atteint l'ordre du kPa en quelques jours. On peut noter que l'épaisseur du clapet n'a pas d'influence sur la courbe de pression mesurée. Cependant, nous avons observé le passage des cellules en dessous du clapet à partir des pressions dépassant 3kPa. A cette pression, la déformation des membranes de 20 et 22μm d'épaisseur est de 25μm et 20μm respectivement. Il semblerait que ce soit la pression plus que la déformation de la membrane à cette pression qui soit limitante. Il est connu que les cellules peuvent se déformer (sans l'influence de forces extérieures) jusqu'à passer au travers de fines constriction dont la taille peut aller jusqu'à 2μm<sup>156</sup>. Bien que dans notre cas les conditions soient différentes (les cellules adhèrent les unes aux autres en formant un ensemble cohésif), les cellules ont tout de même la capacité de se déformer. De plus, les sphéroïdes ont un écoulement très visqueux qui peut également participer dans notre cas au passage de quelques cellules sous le clapet<sup>150</sup>. C'est la limite de cette membrane suspendue : elle peut couvrir une gamme de pression allant de 0 à 3kPa.



Par ailleurs, afin de valider la méthode utilisée, les courbes de croissance ont été comparées à la courbe de croissance obtenue d'un sphéroïde confiné dans un hydrogel (agarose). Une fois que le sphéroïde est à confluence dans la chambre de culture du dispositif microfluidique, les résultats montrent une dynamique similaire entre les deux méthodes expérimentales (voir annexe 7). Cela suggère que les cellules ont été alimentées de manière similaire et que la pression de croissance ne dépend pas du type de confinement spatial.

#### d. Récupération de l'échantillon

A la fin de l'expérience, il est possible d'ouvrir à nouveau les chambres de culture pour récupérer les sphéroïdes confinés et étudier l'effet de la relaxation des contraintes mécaniques. C'est un avantage considérable car il existe peu de dispositifs expérimentaux qui permettent de récupérer l'échantillon. Cela est possible dans les dispositifs d'inclusion d'échantillons dans des hydrogels, cependant il est nécessaire de passer par un traitement chimique.

Voici des images montrant le procédé de récupération de l'échantillon :

Spheroid retrieval illustrated in 3 steps

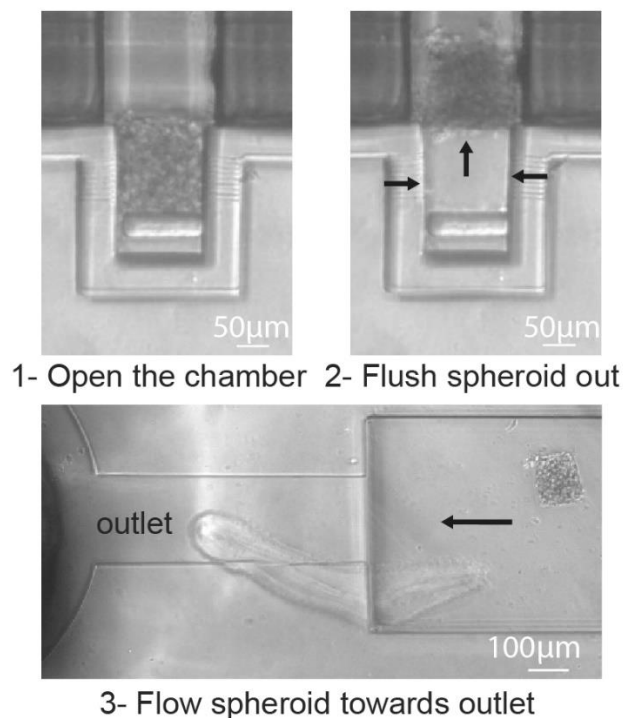


Figure 53 - Récupération d'un sphéroïde confiné en trois étapes.

Nous avons constaté que les échantillons récupérés étaient de formes cubiques. Il serait intéressant de capturer une dynamique de relaxation et de mener des analyses complémentaires sur les échantillons confinés (western blot, immunofluorescence, etc.)

Néanmoins, notons que la récupération de l'échantillon n'est pas systématique car cela est possible uniquement si l'expérience n'a pas été interrompue par le passage d'une bulle dans les canaux de culture. C'est un problème majeur en microfluidique, que j'ai rencontré lors de mes expériences en raison de leur longue durée (4 jours).

## 4. Conclusion et perspectives

---

### a. Conclusion

La tumeur-sur-puce a été validée pour confiner spatialement des sphéroïdes en parallèle. Les taux de croissance des sphéroïdes « contrôles » dans la puce ont montré une dynamique comparable à celle observée dans des puits de culture classiques, relatant une alimentation optimale des échantillons. Grâce à la mobilité des tiges, les sphéroïdes peuvent être chargés dans le dispositif puis récupérés en fin d'expérience.

Un capteur de pression sous forme de membrane rectangulaire a été intégré dans le dispositif. Les simulations réalisées sur le logiciel Comsol ont révélé qu'une membrane attachée sur son arrêt supérieure était la configuration idéale pour réaliser nos mesures. Nous avons pu effectivement collecter des courbes de pression de croissance allant de 0 à 2,5kPa. Cependant, nous avons pu voir qu'en dessous de 250Pa, la pression est sous-estimée dû à une zone de contact plus faible entre le sphéroïde et la membrane que celle simulée sur le logiciel. Au-delà de 2,5kPa, la déformabilité des cellules entraînent leur passage sous la membrane ce qui limite la mesure des valeurs de hautes pressions. Par ailleurs, l'automatisation des analyses via le logiciel Matlab a été robuste pour des expériences imagées au 20x.

La microfabrication de la puce et des tiges en utilisant la méthode des films secs ainsi que de la résine liquide (SU8) s'est révélée difficile. Le mauvais alignement des couches a été un problème récurrent qui engendrait des fuites lors de l'utilisation du système. Le contrôle des épaisseurs ne s'est pas révélé reproductible, entraînant de nouveaux essais en salle blanche pour réussir à fabriquer le moule.

En ce sens, il était primordial de tester une autre méthode de fabrication, plus robuste mais également plus simple pour faciliter l'optimisation du dispositif. Le Nanoscribe est un équipement qui a répondu à nos attentes, puisqu'aucun défaut d'alignement n'a été repéré et que la fabrication des dispositifs a été rapidement reproductible. Le recours à la gravure du verre avec la machine de chez Femtika a également été validé, puisque les tiges ont pu être produites et calibrées en taille. De plus, elles ne sont pas autofluorescentes, ce qui représente un

avantage considérable pour les expériences de biologie. Enfin, la chimie du verre est bien maîtrisée, ce qui permettrait de pouvoir réaliser des traitements de surface robustes.

## b. Perspectives

La fabrication des moules au Nanoscribe offre de nouvelles perspectives pour améliorer les performances de la puce microfluidique. Cet équipement nous permet d'avoir accès à une meilleure résolution : nous avons pu réaliser des membranes de 10 $\mu$ m sur 100 $\mu$ m de hauteur. En revanche, le développement des membranes n'est pas encore optimal : nous avons constaté la présence de résine non polymérisée à la base de la membrane. Il semblerait que le développeur de la résine ne diffuse pas suffisamment dans les zones étroites du moule. Pour pallier ce problème, il serait intéressant de fabriquer des chambres moins hautes, ayant 50 $\mu$ m de hauteur par exemple, pour optimiser l'étape du développement. Notons qu'à cette épaisseur, il est possible de réaliser des membranes plus fines, pour augmenter la sensibilité du capteur aux valeurs de faible pression.

L'équipement Femtika qui nous a servi à fabriquer les tiges en verre étant arrivé à la fin de ma thèse, nous n'avons pas pu faire de tests. Notamment, lors d'une commande ultérieure réalisée auprès de cette société, nous avons découvert qu'il était possible de structurer les canaux des tiges en trois dimensions. C'est un avantage plutôt rare en microfluidique, qui permet d'envisager d'intégrer des fonctions supplémentaires au dispositif.

Les tiges sont des éléments versatiles qui peuvent être fonctionnalisés en fonction de l'application recherchée. A l'inverse des puces microfluidiques, elles peuvent également être réutilisées, ce qui est particulièrement intéressant en électrochimie par exemple, ou certains métaux peuvent être onéreux.

Nous avons vu dans le chapitre d'introduction que le métabolisme des tumeurs était sensiblement différent de celui des tissus sains. On remarque par exemple une acidification du micro environnement suite à un recours supérieur à la normale de la voie glycolytique anaérobie pour couvrir des besoins énergétiques importants.

Nous avons donc pensé à la création d'électro-tiges, en utilisant les mêmes éléments mobiles qui nous servent à ouvrir et refermer les chambres de culture, fonctionnalisés avec des électrodes afin de réaliser des études sur le métabolisme des sphéroïdes.

En consultant le Dr. Ali Maziz, spécialiste en microsystèmes électromécaniques, nous nous sommes positionnés sur le choix des électrodes :

- Mesures de pH : utilisation de l'oxyde d'Irridium pour l'électrode de travail et de l'argent pour l'électrode de référence
- Mesure du taux d'oxygène : utilisation du black platine pour l'électrode de travail et de l'argent pour l'électrode de référence.

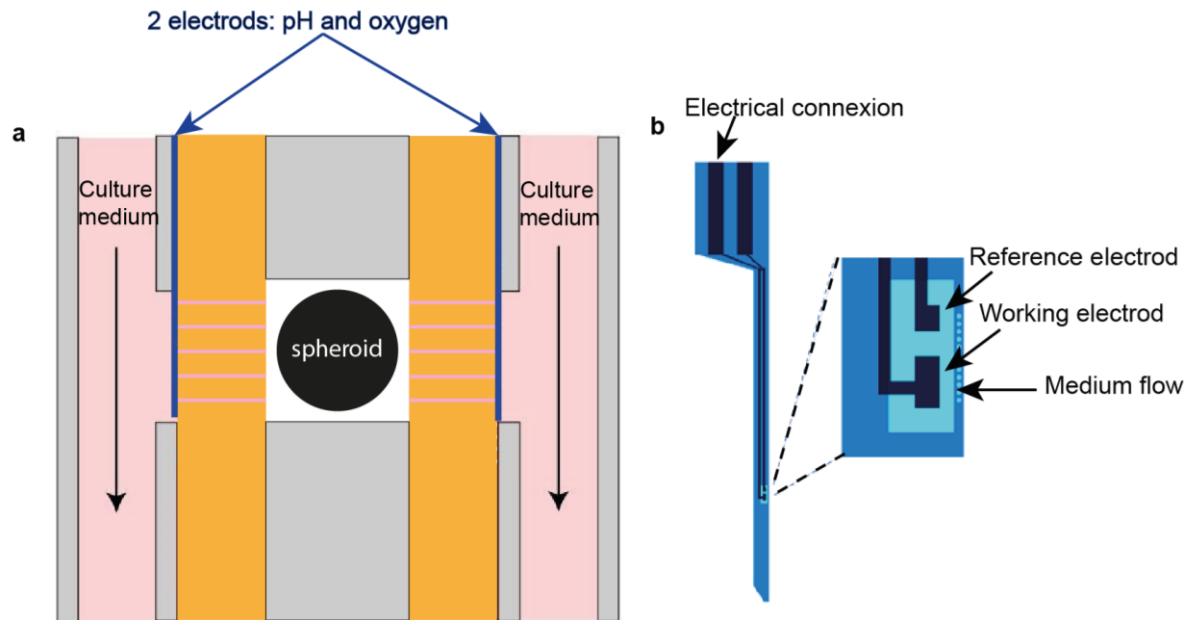


Figure 54 - a. Dispositif expérimental. b. Schématisation d'une électro-tigette.

Pour le choix du dispositif, nous avons préféré utiliser le design du Dr. Zacchari Ben-Meriem, dans lequel le canal de la tigette sert à la circulation du milieu de culture. L'électrode serait donc positionnée sur la face qui n'est pas en contact avec l'échantillon pour limiter la polarisation des cellules lors de la mesure (voir Figure 54a).

Un premier design d'électrotigettes réalisé sur Clewin est montré en Figure 54b. Sur celui-ci on trouve une zone dédiée aux connexions électriques positionnée sur l'extrémité de la tigette. Il y a également deux électrodes sur la partie plus fine de la tigette : l'électrode de référence ainsi que l'électrode de travail. Des petits canaux d'alimentations sont positionnés sous les électrodes pour permettre la circulation du milieu au travers de la tigette.

Pour réaliser les expériences, nous avons prévu d'utiliser la même méthode que celle employée par la machine « Seahorse », qui consiste à bloquer le renouvellement du milieu de culture pendant quelques minutes avant la prise de la mesure. Cela permet d'enrichir l'environnement avoisinant l'électrode en espèces chimiques à mesurer et réduire le bruit lors de la détection.



# Chapitre 3 : Pression de croissance dans un sphéroïde libre et confiné

---

## Partie 1 : Le cas du sphéroïde « libre »

---

Ce que j'appelle un sphéroïde « libre » est un sphéroïde qui n'est pas inclus dans un environnement solide, comme par exemple un hydrogel. Il est cultivé dans un milieu de culture, sur un coussin d'agarose : sa croissance n'étant pas contrainte, elle est dite libre. Ainsi, contrairement à la partie précédente, il ne développe pas de pression de croissance à sa surface. Cela étant dit, nous pouvons considérer les cellules du centre du sphéroïde comme confinées par leurs voisines à qui elles adhèrent. Nous allons explorer dans cette partie la pression de croissance que peuvent ressentir les cellules au sein du sphéroïde, confinées élastiquement par leurs voisines.

Fung<sup>157</sup> a été le premier à discuter de la présence de contraintes résiduelles dans les tissus. Elles correspondent aux contraintes qui demeurent dans un tissu malgré la suppression des charges externes qui s'appliquent sur celui-ci. En d'autres termes, si l'on extrait une partie d'un tissu de son environnement biologique, le tissu peut avoir accumuler des contraintes solides induite par une densification du tissu, qui demeurent malgré son extraction. L'une des méthodes expérimentales pour rechercher la présence de contraintes résiduelles dans un tissu *ex-vivo* consiste à effectuer une coupe dans ce dernier et à observer les changements de formes à l'interface de la coupe<sup>158</sup>. Ainsi, la présence de contraintes résiduelles a été révélée dans la paroi des artères, le cœur ainsi que le cerveau<sup>159-162</sup>. L'une des conclusions très intéressantes de ces articles, est que la modulation de ces contraintes résiduelles dans les tissus à une influence sur les fonctions physiologiques des organes. Chez le rat, les contraintes résiduelles jouent un rôle important sur la dynamique cardiaque. Par exemple, elles peuvent affecter indirectement la force de contraction, le volume systolique (quantité de sang éjectée à chaque contraction) et la consommation d'oxygène dans les tissus, en modifiant la distribution des contraintes de chacune des fibres musculaires juste avant la phase de dilatation du cœur (diastole)<sup>160</sup>. Dans le cerveau des rats, il a également été montré que le couplage entre la matière blanche sous tension et la matière grise sous compression peut apporter une stabilité supérieure au cerveau pour son

bon fonctionnement, comme le tractus (faisceau d'axone) de la matière blanche relie les deux hémisphères du cerveau<sup>161</sup>.

La présence de contraintes résiduelles a également été observée dans les tumeurs solides<sup>158</sup>. Leur origine a notamment été discutée au travers de plusieurs hypothèses. Les fibres de collagène présentes dans la matrice extracellulaire peuvent contribuer à l'accumulation de contraintes solides en confinant les cellules prolifératrices de par leur résistance à l'élongation. Par ailleurs, les fibroblastes associés au cancer (CAFs, Cancer-Associated Fibroblasts), qui participent à la sécrétion du collagène, peuvent également contribuer à l'accumulation de contraintes résiduelles. Contrairement au collagène, l'acide hyaluronique (polysaccharide sécrété par les cellules et présent dans la matrice extra-cellulaire) résiste à la compression. Ce sont des chaînes négativement chargées qui se repoussent à cause de la répulsion électrostatique et de l'eau piégé, qui permettent de former une matrice peu compressible. Dans le cas de l'accumulation de contraintes résiduelles, l'acide hyaluronique aurait un rôle uniquement lorsqu'il est présent à l'intérieur de la tumeur, car c'est un environnement sous compression. Enfin, la division non contrôlée des cellules cancéreuses dans un espace limité entraîne une accumulation importante de contraintes dans les tissus. En comprimant les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et en créant de l'hypoxie (manque d'apport en oxygène au niveau des tissus), ces contraintes contribuent à la progression tumorale ainsi qu'à la résistance à certains traitements<sup>163</sup>.

## 1. Les sphéroïdes stockent des contraintes solides liées à leur croissance

---

A l'échelle micrométrique, les tumeurs sont des populations de cellules hétérogènes avec une organisation tri-dimensionnelle. Cependant, à partir d'une certaine échelle de l'ordre de la centaine de microns, les tumeurs deviennent plus homogènes en termes de conditions chimiques. Dans ce cas, les sphéroïdes sont de bons modèles pour récapituler la structure à 3D des microtumeurs<sup>164</sup>. Dans une étude de Guillaume *et al.*<sup>165</sup>, les auteurs s'interrogent sur les propriétés physiques des sphéroïdes : sont-elles semblables mécaniquement à celles des microtumeurs qu'ils modélisent ? Pour le savoir, ils ont réalisé des coupes sur des sphéroïdes. Ils ont alors observé trois phénomènes (voir Figure 55a) :

- Une ouverture des sphéroïdes faisant suite à l'incision, très probablement due à une rupture de la tension de surface des sphéroïdes.
- Une rétraction localisée sur la bordure extérieure de la coupe, due à un rééquilibrage de la tension de surface.
- Une relaxation des cellules situées à l'interface de la coupe, certainement provoquée par la présence de forces compressives à l'intérieur du sphéroïde.

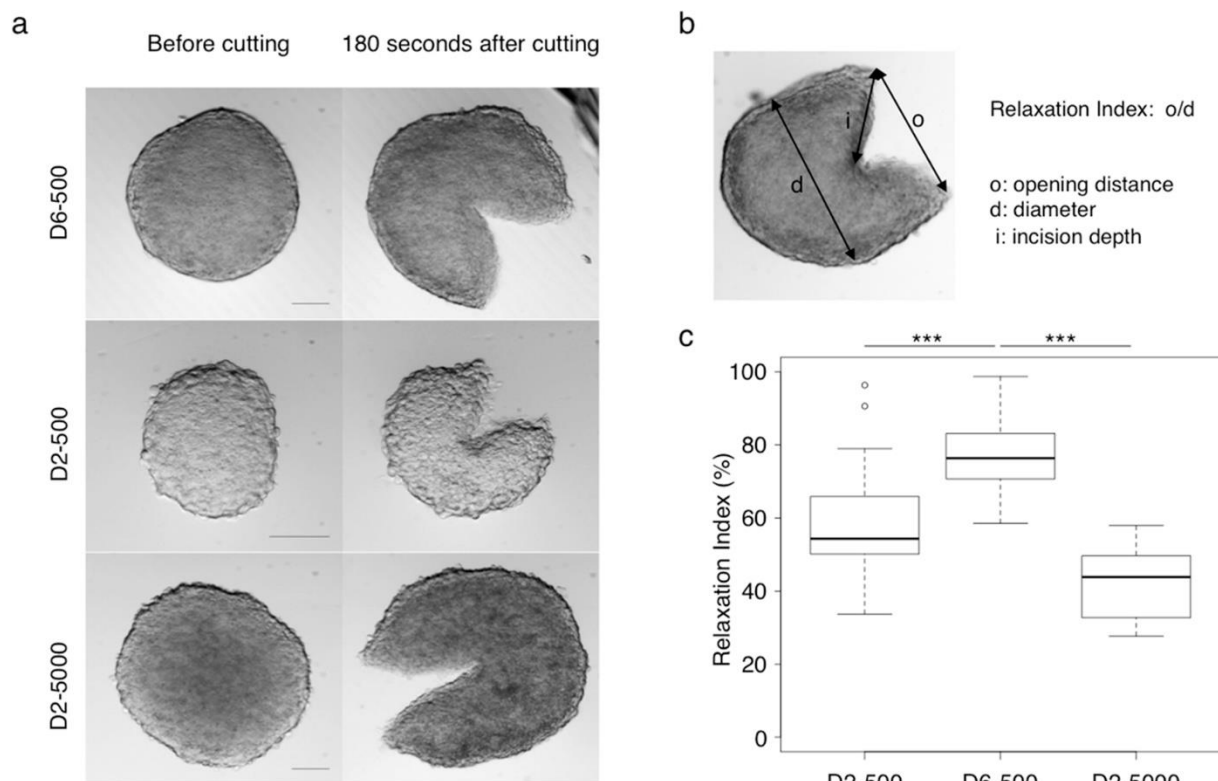


Figure 55 - Cette figure a été tirée de l'article de Guillaume *et al.*, et montre en a. des images avant et après incision de sphéroïdes pour différentes conditions: D6-500 - sphéroïdes coupés au jour 6 et fabriqués à partir de 500cellules; D2-500 - sphéroïdes coupés au jour 2 et fabriqués à partir de 500cellules. D2-5000 - sphéroïdes coupés au jour 2 et fabriqués à partir de 5000cellules. b. Image montrant les différents paramètres mesurés pour calculer l'indice de relaxation. c. Graphique représentant les valeurs de l'indice de relaxation pour les trois conditions de culture précédemment citées.

En mesurant la longueur de l'ouverture ainsi que le diamètre des sphéroïdes, les auteurs calculent un indice de relaxation qu'ils utilisent pour comparer des sphéroïdes ayant eu des conditions de culture différentes (voir Figure 55b). Leurs résultats montrent (voir Figure 55c) que les sphéroïdes coupés au jour 2 (D2-500) ont un indice de relaxation plus faible que les sphéroïdes ayant initialement le même nombre de cellules mais qui sont incisés au jour 6 (D6-500). Comme les sphéroïdes incisés au jour 6 sont de plus grandes tailles que ceux incisés au jour 2, il a fallu démontrer que la différence des indices de relaxation n'était pas due à une



variation des volumes entre les sphéroïdes. Ainsi, en faisant des incisions au jour 2 sur des sphéroïdes ayant la même taille que ceux cultivés jusqu'au jour 6, les auteurs trouvent un indice de relaxation plus faible. De fait, les sphéroïdes qui ont été cultivés pendant une période trois fois plus longue que les autres (D6-500) ont eu certainement plus de cellules en croissance, ce qui a pu engendrer un stockage plus conséquent de contraintes solides, qui sont à l'origine d'un indice de relaxation plus grand. Ces travaux ont permis de montrer que les sphéroïdes stockent des contraintes solides qui sont induites par la croissance des cellules et augmentent avec le temps. Nous avons réalisé cette expérience (voir Figure 56) et observé également la relaxation des cellules présente à l'interface de la coupe. Par contre nous avons travaillé sur de tous petits sphéroïdes (100 $\mu$ m) ce qui fait que nous n'avons pas pu reproduire l'expérience car la coupe était très difficile à réaliser.

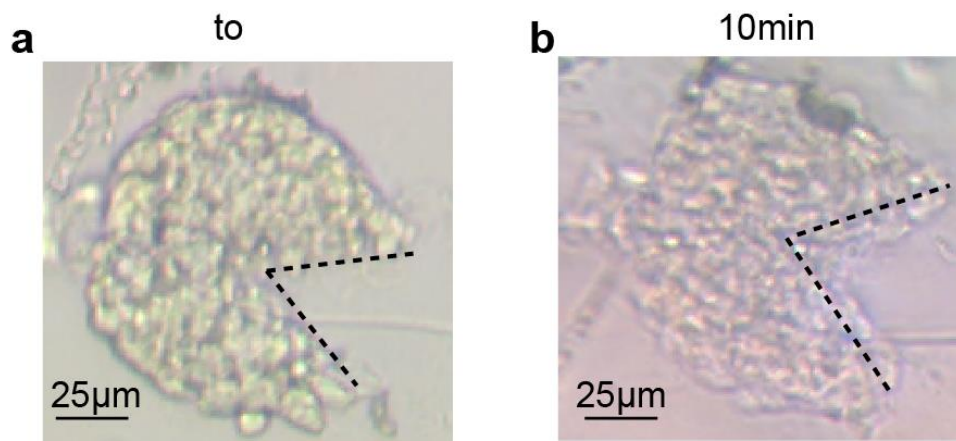


Figure 56 - Coupe de sphéroïde : a. Image d'un sphéroïde incisé à to. b. Image d'un sphéroïde 10min après l'incision.

## 2. Modélisation de la croissance d'une cellule dans un sphéroïde libre

---

Lors de la croissance d'une tumeur solide, les cellules poussent contre l'environnement qui les entoure pour créer suffisamment d'espace pour un doublement (en moyenne) du volume et une division cellulaire. Elles exercent donc une force physique envers leur micro environnement pour le déformer. Si l'on considère que les cellules évoluent dans un tissu et un environnement purement élastique, elles subiront lors de leur croissance des contraintes qui sont proportionnelles au module de Young du matériau qui les entoure.

Si une cellule dans un tissu a une croissance qui dépend entre autres de la rigidité du micro environnement qui l'entoure, qu'en est-il de la croissance d'une cellule au sein d'un

sphéroïde « libre », comme celui-ci n'est pas contraint par un environnement solide ? En particulier, si l'on s'intéresse à la pression de croissance que développe une cellule afin d'augmenter son volume avant de se diviser, est-elle semblable pour toutes les cellules indépendamment de leur localisation au sein d'un sphéroïde libre ?

Il existe peu d'études qui ont été faites pour quantifier précisément la valeur de la pression de croissance d'une cellule unique, qu'elle soit libre ou qu'elle évolue à l'intérieur d'un agrégat de cellules ou dans un tissu. Expérimentalement, la pression interne d'une cellule confinée entre deux plaques parallèles a déjà été mesurée au moyen d'un AFM. Dans ces conditions, les cellules HeLa ont une pression hydrostatique interne de 40Pa pendant l'interphase, qui augmente jusqu' à 400Pa pendant la mitose<sup>166</sup>. Le confinement entre les plaques étant unidirectionnel et donc anisotrope, celui-ci ne reflète pas l'état d'une cellule entièrement confinée comme c'est le cas dans un sphéroïde ou un tissu par exemple. A notre connaissance, il n'existe pas encore de moyens expérimentaux pour mesurer la pression de croissance d'une cellule présente dans un agrégat ou un tissu.

Si aucune expérience n'a pu être mise au point pour sonder la pression de croissance en cellule unique dans un sphéroïde ou un tissu, c'est que les mesures pour y parvenir semblent très complexes. En revanche, des simulations numériques peuvent être de bons moyens pour y arriver. C'est dans ce contexte que nous avons collaboré avec Hélène Delanoë, maîtresse de conférences à l'ILM (Institut Lumière Matière) pour modéliser la croissance d'une cellule dans un sphéroïde.

#### a. Présentation de la simulation

Hélène a réalisé des simulations sur le logiciel d'éléments finis Comsol. Un sphéroïde est modélisé par une sphère élastique homogène (voir Figure 57). Dans cette sphère, une cavité pressurisée est insérée. Elle représente la croissance d'une cellule dans un sphéroïde. La symétrie sphérique permet de ne simuler qu'un huitième de la sphère. La cavité (ou cellule) possède une forme sphérique, semblable aux cellules qui s'arrondissent lors de leur entrée en mitose<sup>167,168</sup>. Cette simulation est volontairement très simplifiée et a pour but de nous permettre d'obtenir une estimation du

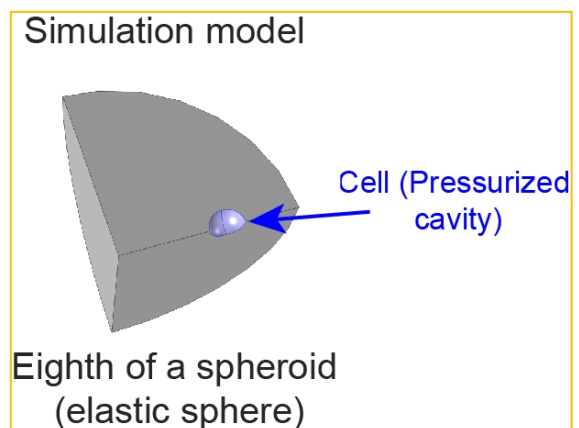


Figure 57 - Modèle utilisé pour la simulation.

déplacement de la surface cellulaire lorsque la cellule augmente en volume pour une pression préalablement définie en paramètre d'entrée. J'ai collaboré avec Hélène afin de faire varier divers paramètres et modéliser au plus proche de nos conditions expérimentales. L'objet de l'étude consiste à faire varier la position de la cellule le long du rayon du sphéroïde, et d'examiner comment cette dernière déforme son environnement sous l'effet de sa pression de croissance.

Plusieurs hypothèses ont été émises sur le modèle. Ainsi, on considère dans nos simulations :

- Un sphéroïde homogène sans matrice.
- La croissance d'une seule cellule à la fois.
- Que les cellules ont toutes le même diamètre.
- Que les cellules sont toutes capables de croître.

## b. Définitions des paramètres de la simulation

En reprenant les simulations d'Hélène, j'ai pu paramétrer le modèle aux conditions expérimentales que nous avons fixées ou mesurées lors de la culture cellulaire des sphéroïdes, à savoir :

- Des sphéroïdes ayant un diamètre de  $100\mu\text{m}$ . A cette taille, nous nous affranchissons théoriquement des gradients chimiques qui peuvent exister dans des plus gros sphéroïdes<sup>169</sup>. Cette taille correspond également à celle des sphéroïdes que nous injectons dans les puces microfluidiques, ce qui nous permettra dans la deuxième partie de ce chapitre, de réaliser des comparaisons entre simulations et expériences.
- L'élasticité des sphéroïdes est fixée à  $2,4\text{kPa}$  et correspond à la mesure qui a été faite par Sylvain Landiech sur des sphéroïdes de cellules HeLa que nous utilisons ici. Cette mesure a été faite en utilisant la technique de l'aspiration par micropipette présentée en annexe 11.
- Des cellules de  $9\mu\text{m}$  de diamètre. En se servant d'un fluorochrome (DAPI) qui s'intercale entre les bases de l'ADN, j'ai pointé successivement en 3D le centre des noyaux fluorescents de chacune des cellules présentes dans un sphéroïde. Puis, à l'aide d'un programme Matlab, nous avons calculé la distance de noyau à noyau à partir de la distance des plus proches voisins, comme représenté en Figure 58a. En considérant que le sphéroïde ne produit pas de matrice extra-cellulaire, cette distance est comparable au diamètre d'une cellule. Cette analyse nous a permis d'obtenir une distribution de

probabilité liée à la taille des cellules dans un sphéroïde (Figure 58b). Nous avons mesuré un diamètre moyen des cellules de  $9\mu\text{m}$ , que ce soit à 10, 30 et  $50\mu\text{m}$  du centre du sphéroïde (voir Figure 58c), ce qui suggère qu'il n'y aurait pas de gradient de la taille des cellules avec le rayon du sphéroïde.

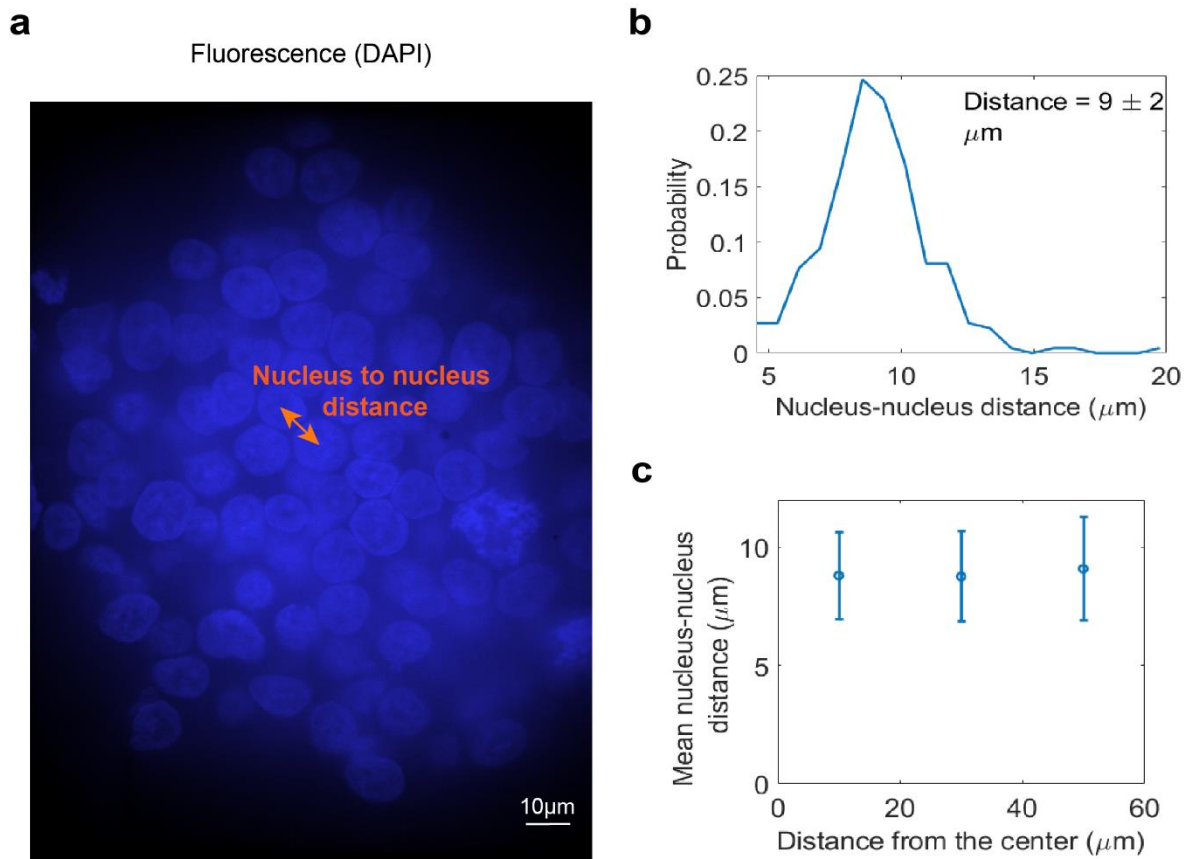
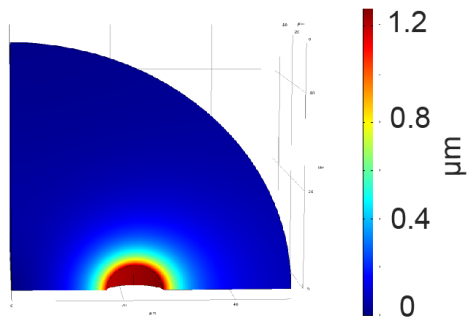


Figure 58 - a. Exemple d'une image utilisée lors de l'analyse du diamètre des cellules, qui correspondant à la tranche d'un sphéroïde marquée par le fluorochrome DAPI. b. Distribution de la probabilité des distances obtenues de noyau à noyau. c. Représentation de la distance moyenne obtenue à 10, 30 et  $50\mu\text{m}$  du centre du sphéroïde.

En utilisant les paramètres décrits ci-dessus, j'ai pu simuler la déformation d'une cellule en fonction de sa position dans le sphéroïde, par exemple à une position de  $22\mu\text{m}$  ou  $40\mu\text{m}$  comme le montre les images (a) et (b) de la Figure 59.

**a**  
Cell displacement at 22 $\mu\text{m}$  for P=400Pa



**b**  
Cell displacement at 40 $\mu\text{m}$  for P=400Pa

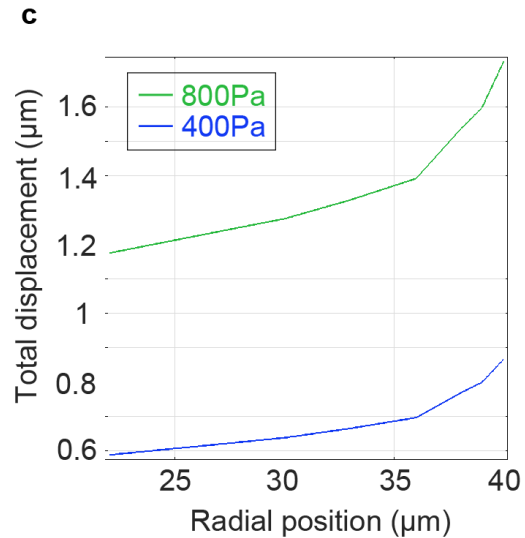
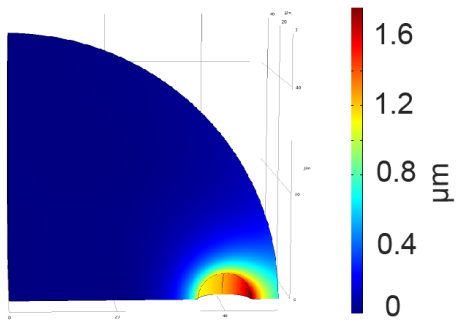


Figure 59- a. Visualisation de la déformation de la cellule positionnée à 22 $\mu\text{m}$  du centre du sphéroïde, pour une pression de croissance valant 400Pa. b. Visualisation de la déformation de la cellule positionnée à 40 $\mu\text{m}$  du centre du sphéroïde, pour une pression de croissance valant 400Pa. c. Graphique présentant l'évolution du déplacement total de la cellule en fonction de sa position par rapport au centre du sphéroïde.

Le graphique de la Figure 59c présente l'évolution du déplacement total au bord de la cellule en fonction de sa position par rapport au centre du sphéroïde, pour deux valeurs de pression de croissance : 400Pa (courbe bleue) et 800Pa (courbe verte). Nous pouvons voir que le déplacement total de la cellule pour les deux valeurs de pression de croissance augmente à mesure que celle-ci se rapproche du bord du sphéroïde ( $x=40\mu\text{m}$ ). Par exemple, pour la courbe à 800Pa, le déplacement du bord de la cellule vaut 1,7 $\mu\text{m}$  au bord et 1,2 $\mu\text{m}$  au centre du sphéroïde. Cette simulation suggère donc qu'il est plus difficile pour une cellule de se déformer au centre du sphéroïde qu'au bord.

### c. Calcul de la pression de croissance

En utilisant les valeurs de déplacements obtenus lors des simulations, nous pouvons calculer la valeur de la pression de croissance nécessaire pour qu'une cellule se déforme de manière identique quel que soit sa position. Pour l'ensemble des simulations présentées par la suite, nous

avons choisi de modéliser le cas d'une cellule de  $3,93\mu\text{m}$  de rayon qui double en volume. Cela correspond à une variation de  $1\mu\text{m}$  au niveau du rayon de la cellule (voir détail des calculs présentés en annexe 12), ce qui nous a permis de fixer le déplacement des cellules à  $1\mu\text{m}$  pour l'ensemble des simulations.

Le graphique présenté sur la Figure 60a représente les valeurs de la pression de croissance développée par une cellule doublant son volume au sein d'un sphéroïde de  $100\mu\text{m}$  de diamètre. On peut voir qu'une cellule qui se divise à  $5\mu\text{m}$  du bord du sphéroïde développe une pression de croissance de  $390\text{Pa}$  tandis que si elle se trouve à  $10\mu\text{m}$  du centre, sa pression de croissance pour atteindre la même taille est de  $850\text{Pa}$ . Cette différence s'explique dans notre simulation par un micro environnement localement plus rigide au centre qu'au bord.

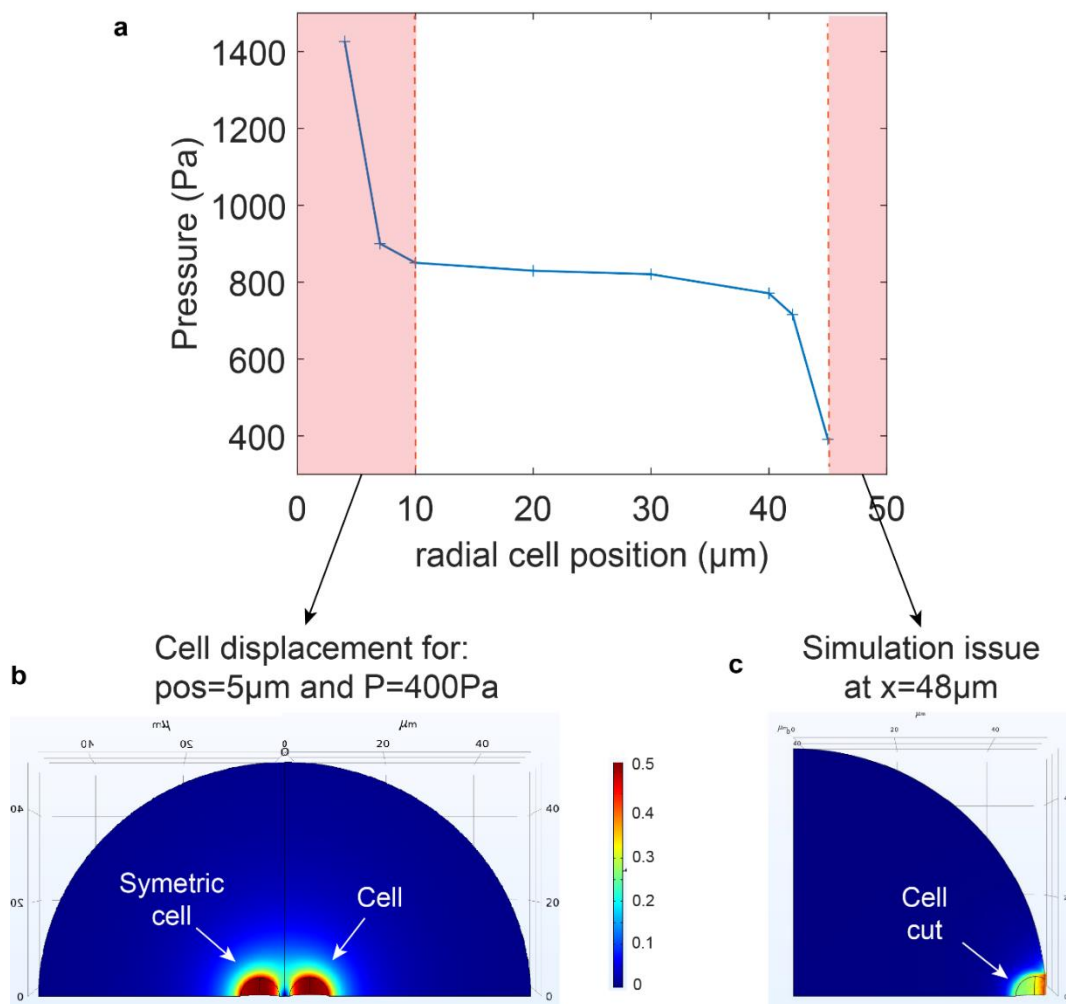


Figure 60- a. Valeur de pression de croissance nécessaire pour qu'une cellule double en volume, en fonction de sa position par rapport au centre du sphéroïde. b. Représentation de la déformation de la cellule à une position de  $5\mu\text{m}$  avec  $P=400\text{Pa}$ . c. Illustration du problème rencontré pour  $45 < x < 50\mu\text{m}$  : la cavité est « coupée » dans la simulation et il est impossible de mesurer sa déformation sur le bord droit.

Dans la zone située à moins de  $5\mu\text{m}$  du bord du sphéroïde, il est impossible d'obtenir la valeur de la déformation de la cavité à partir de la simulation car la cavité est coupée lorsqu'elle se déforme et le programme affiche une erreur. Cette zone ne pourra donc pas faire partie de cette étude. La deuxième zone colorée en rose se trouve à moins de  $10\mu\text{m}$  du centre du sphéroïde et est un peu particulière (voir Figure 60) : la construction du modèle étant symétrique, une cellule positionnée dans cette zone devient proche de son symétrique, ou, de manière équivalente, le déplacement au centre du sphéroïde est 0 par construction. Cela a pour effet d'augmenter considérablement la pression de croissance de la cellule d'intérêt, ce qui est un résultat intéressant mais ne fait pas partie du cœur de cette étude. En effet, cette géométrie permet d'apporter des éléments de réponse quant à l'évolution de la pression de croissance d'une cellule lorsque celle-ci est proche d'une autre cellule en croissance, qui seront discutés à la fin de ce chapitre.

Par ailleurs, nous nous interrogeons sur la valeur de pressions de croissance au bord. Nous avons pour hypothèse que cette pression s'approche de la pression de Laplace, c'est pourquoi nous avons tenté de la mesurer en nous appuyant sur des mesures expérimentales de fusion de sphéroïde qui sont présentés par la suite.

#### d. Estimation de la pression de Laplace

La présence de la tension de surface dans les tissus biologiques a été révélée en 1963 par Steinberg<sup>170</sup>, qui l'a identifiée comme l'un des mécanismes expliquant les mouvements des tissus lors de la morphogénèse. Les sphéroïdes sont des objets biologiques qui possèdent également une tension de surface, leur conférant leur géométrie sphérique<sup>171</sup>. A l'équilibre, la tension de surface est compensée par la pression de Laplace, qui maintient la forme sphérique de cet agrégat cellulaire. Rappelons que la pression de Laplace représente une différence de pression entre deux interfaces courbe séparées par un milieu liquide. Il est difficile de connaître la valeur de la pression de croissance sur la première couche externe du sphéroïde car les cellules sont sous tension, et sont en contact avec le milieu liquide. En revanche, pour des cellules présentes dans les couches internes du sphéroïde, nous pensons que la pression de Laplace est une pression homogène qui doit se superposer à la pression de croissance. Nous avons mesuré expérimentalement sa valeur afin de pouvoir la comparer à l'ordre de grandeur de la pression de croissance simulée.

Pour cela, nous avons réalisé plusieurs expériences de fusion en plaçant côte à côte deux sphéroïdes de la lignée cellulaire HeLa dans un puit en agarose (voir Figure 61a). Au fil du temps, les deux sphéroïdes fusionnent et leur zone de contact, qui est circulaire, augmente<sup>172</sup>. En mesurant le rayon de contact entre les deux sphéroïdes (voir Figure 61a, image de droite), on peut retrouver la tension de surface grâce au modèle de coalescence des fluides visqueux (la méthode est décrite en annexe 13). A partir du graphique présentant l'évolution du rayon au carré de la zone de contact entre les sphéroïdes (voir Figure 61b), nous obtenons une tension de surface de  $0,91 \pm 0,24$  mN/m pour la lignée HeLa.

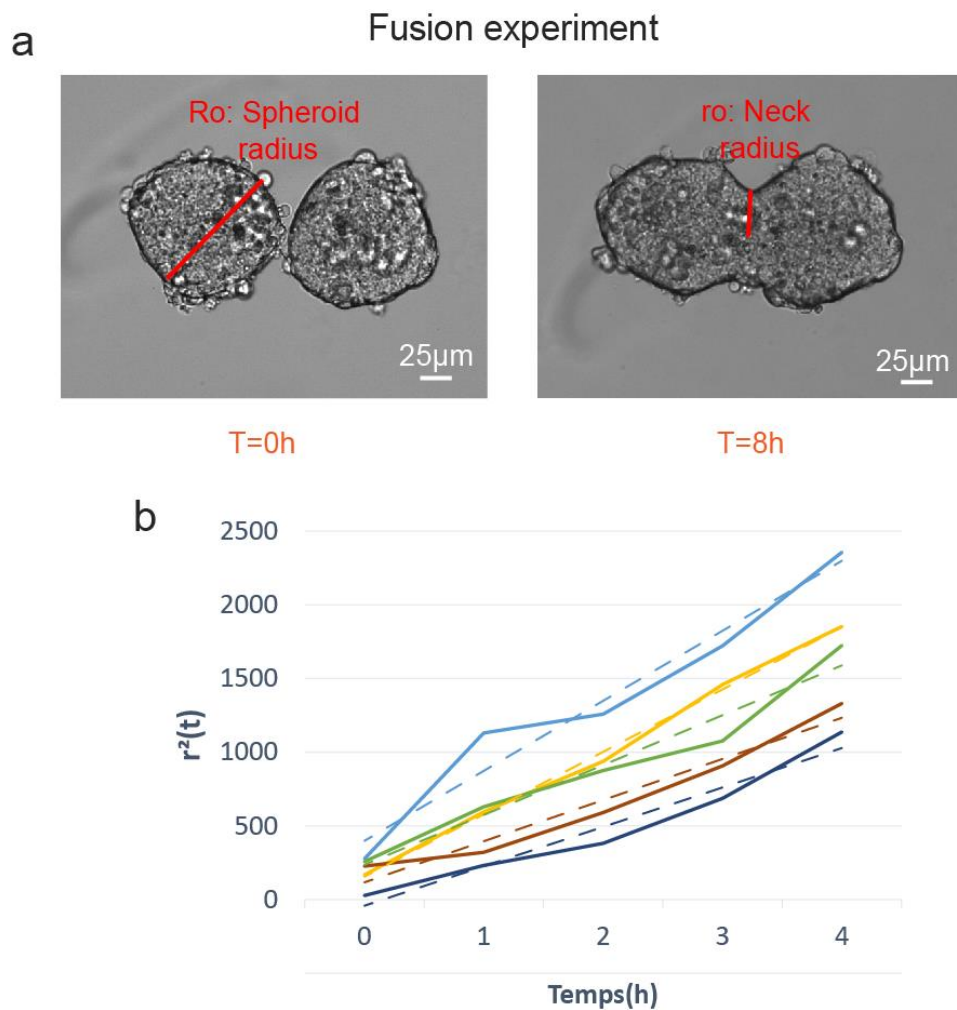


Figure 61 - a. Expérience de fusion entre deux sphéroïdes : à  $t_0$  (image de gauche) et à  $t=8h$  sur l'image de droite. On peut observer la formation d'une zone de contact entre les deux sphéroïdes. b-Graphique représentant l'évolution de  $r^2(t)$ . Chaque courbe pleine correspond à une expérience sur deux sphéroïdes, associée à sa courbe de tendance en pointillée.

Grâce à la tension de surface, nous avons donc pu déterminer la pression de Laplace des sphéroïdes. En utilisant le cas particulier « d'une goutte sphérique », l'expression vaut :

$$P_{Laplace} = 2 * \left(\frac{\gamma}{R}\right)$$



Avec  $\gamma$  la tension de surface et  $R$  le rayon du sphéroïde.

Pour un sphéroïde de  $100\mu\text{m}$  de diamètre, on trouve  $P_{Laplace} = 36,4 \pm 9,6 \text{ Pa}$ .

Nous obtenons donc une pression de Laplace équivalente à  $36,4\text{Pa}$  : ce terme est négligeable par rapport à l'ordre de grandeur de la pression de croissance qui est de  $800\text{Pa}$ . Nous avons choisi de ne pas le prendre en compte dans le résultat des simulations suivantes.

### e. Influence de la taille du sphéroïde

Nous nous sommes interrogés sur l'influence de la taille du sphéroïde sur la génération de pression de croissance des cellules. La longueur typique de diffusion/réaction au sein des sphéroïdes étant de  $100\mu\text{m}$ , les sphéroïdes dont le diamètre est supérieur à  $200\mu\text{m}$  permettent une diffusion moins efficace des nutriments et de l'oxygène jusqu'au centre des sphéroïdes<sup>173</sup>. Cela peut même entraîner l'apparition d'un cœur nécrotique (mort prématurée et non programmée des cellules) qui aurait certainement une grande influence sur la pression de croissance des cellules environnantes, en raison de propriétés mécaniques différentes<sup>174</sup>. Pour cette raison, nous avons choisi de comparer des sphéroïdes de  $100$  et  $200\mu\text{m}$  de diamètre afin de rester dans un cas où expérimentalement la diffusion des nutriments et de l'oxygène ne serait pas limitante.

La Figure 62a présente l'évolution de la pression de croissance développée par une cellule dans un sphéroïde de  $100\mu\text{m}$  (courbe rouge) et  $200\mu\text{m}$  de diamètre (courbe bleue).

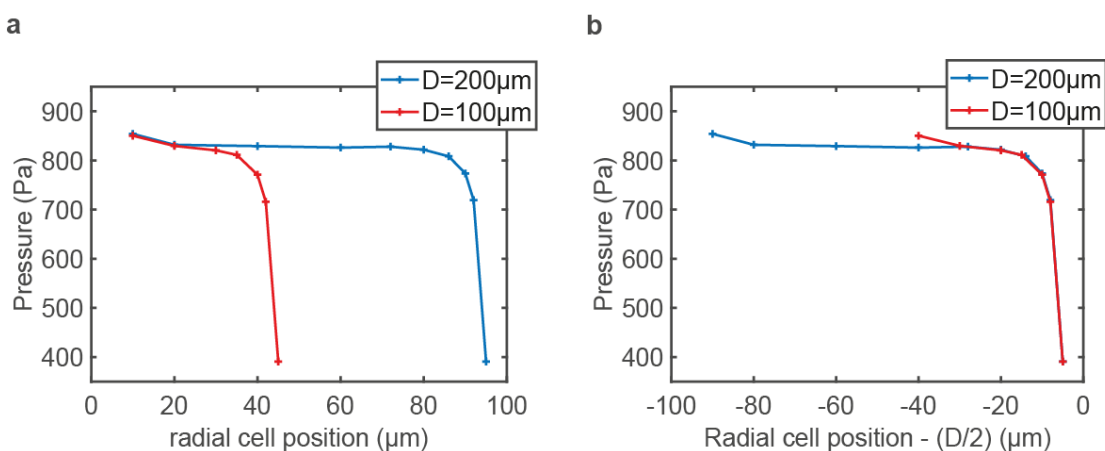


Figure 62-Graphique représentant la comparaison des courbes de pression en fonction de la position de la cellule le long du rayon pour des sphéroïdes de  $200\mu\text{m}$  (courbe rouge) et  $100\mu\text{m}$  (courbe bleue) de diamètre.

Afin de pouvoir comparer le gradient des sphéroïdes malgré leur différence en taille, nous avons soustrait sur l'axe des abscisses de la Figure 62b la position radiale de la cellule par rapport au rayon du sphéroïde ( $D/2$ ). Nous pouvons d'abord observer la présence d'un gradient de pression dans les deux cas dont l'amplitude est similaire : la pression de croissance au centre du sphéroïde et en périphérie est quasi identique : on trouve 850Pa au centre tandis qu'au bord, elle est de 390Pa.

En conclusion, les résultats suggèrent qu'une cellule développerait la même pression de croissance pour se diviser au bord et au centre d'un sphéroïde de 100 et 200 $\mu\text{m}$  de diamètre, avec un gradient assez similaire. Cela vient sûrement du fait que dans ce modèle, la pression de croissance est majoritairement limitée par l'élasticité, qui est identique dans ces deux cas, et qui se propage mécaniquement très proche de la déformation.

#### f. Influence du module de Young sur la pression de croissance

La pression de croissance d'une cellule dépend entre autres de la rigidité du micro environnement qui l'entoure. Les simulations précédentes ont été faites à partir des données connues sur la lignée HeLa, dont le module de Young vaut 2,4kPa. Nous avons voulu simuler la pression de croissance d'une cellule se développant dans des sphéroïdes de différentes rigidités. Nous avons choisi de comparer le développement d'une cellule dans un sphéroïde très mou (100Pa), avec un sphéroïde de rigidité intermédiaire (2,4kPa) et un sphéroïde plutôt rigide (5kPa) : les résultats sont présentés sur la Figure 63 :

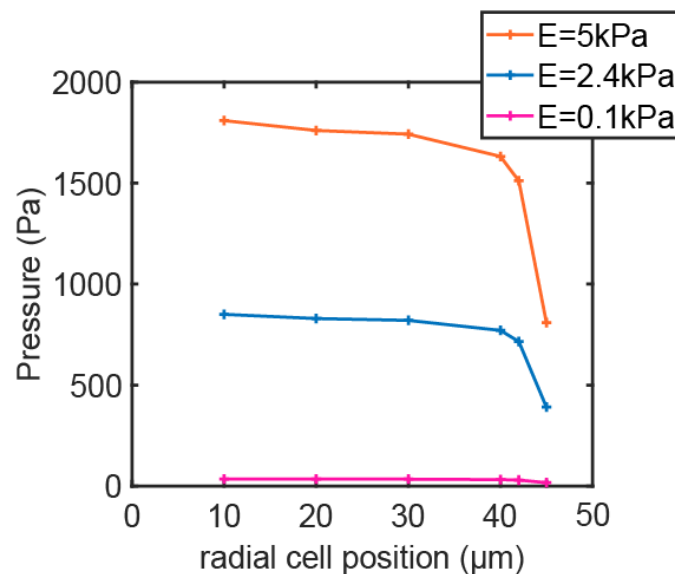


Figure 63 - Représentation des valeurs de pressions développées par la cellule dans le cas d'une croissance dans un sphéroïde ayant une élasticité de 5kPa (courbe orange) 2,4kPa (courbe bleue) et 100Pa (courbe rose).

Le module de Young traduit la rigidité d'un matériau. Un module de Young très élevé est caractéristique d'une forte rigidité. Ainsi, on peut voir que plus la rigidité du sphéroïde est élevée, plus la cellule doit développer une forte pression pour déformer son environnement. Pour une rigidité forte (5kPa), la valeur de la pression de croissance à 10 $\mu$ m du centre vaut environ 1,8kPa. Cela représente un peu plus du double de la pression développée par une cellule au centre d'un sphéroïde de rigidité intermédiaire, comme les HeLa dans notre modèle (850Pa).

Pour des sphéroïdes très « mous », il n'y a pas de gradient de pression entre le bord du sphéroïde et le centre : la cellule développe une pression de croissance qui ne dépend plus de sa position dans le sphéroïde. Cette pression est par ailleurs extrêmement faible. On peut le voir sur la courbe qui correspond à une rigidité de 100Pa (courbe rose) ; il y a seulement 18Pa de différence entre la valeur de la pression de croissance développée par une cellule au centre et au bord. En comparaison, cette différence est de 460Pa pour la courbe à 2,4kPa et est de 1000Pa pour la courbe à 5kPa.

Ces simulations sont relativement récentes. Nous discuterons dans les perspectives de pistes pour aller plus loin dans la compréhension de la pression de croissance au sein d'un sphéroïde. Elles nous permettent néanmoins de donner une origine probable de l'émergence de ces contraintes de pression au sein d'un sphéroïde.

La pression de croissance dépend donc de la rigidité du micro environnement dans lequel la cellule évolue, ce micro environnement pouvant être d'autres cellules dans notre modèle. Nous avons vu que la pression de croissance peut varier d'une trentaine de pascals (sphéroïdes mous) à plusieurs milliers de pascals (sphéroïdes très rigides). Quelle influence peut avoir cette différence de pression sur la concentration en macromolécules présente dans le cytoplasme des cellules, comme montré pour les levures en introduction ? Pour étudier cette question, nous avons fait des mesures rhéologiques sur des cellules cultivées sur un substrat à 2D (sans contraintes de pression) ou des cellules présentes dans des agrégats (sphéroïdes), qui sont donc susceptibles de développer des pressions de croissance différentes, comme nous l'avons vu dans les simulations, en fonction de leur position dans le sphéroïde.

### 3. Evolution de l'encombrement macromoléculaire

---

Rappelons que l'encombrement macromoléculaire est un paramètre biophysique très important car il est susceptible de moduler les réactions biochimiques dans les cellules, notamment en limitant la diffusion de différentes espèces dans la cellule.

#### a. Résultats à 2D

Nous avons réalisé des mesures de micro rhéologie passive à partir de la technologie des GEMs sur des cellules cultivées sur un substrat à 2D dans un milieu liquide. Pour rappel, les GEMs sont des nanoparticules fluorescentes génétiquement exprimées par les cellules. L'absence d'environnement solide autour de la cellule nous permet de caractériser son encombrement cytoplasmique tel qu'il existe sans contraintes externes. Notons en revanche que la cellule est soumise à des contraintes de tension liées à la rigidité du substrat mais que cela ne fait pas partie de l'objet de notre étude (de manière générale, il serait intéressant d'étudier comment la rigidité influence l'encombrement macromoléculaire).

Sur la Figure 64a, on peut voir un exemple d'image prise en lumière fluorescente (GFP) sur laquelle figurent les nanoparticules dans le cytoplasme des cellules. Après avoir réalisé des films de quelques secondes à une cadence de 100Hz pendant lesquelles les GEMs diffusent dans les cellules, le plugin « mosaic » du logiciel ImageJ nous permet d'extraire les trajectoires des nanoparticules (voir Figure 64b). A partir de la durée d'apparition de la particule et de sa position sur les différentes images, un code Matlab<sup>175</sup> permet de calculer le coefficient de diffusion de chacune des nanoparticules imagées à partir d'un ajustement linéaire de la moyenne temporelle du déplacement quadratique moyen de la particule<sup>175</sup> (voir Figure 64c). Ainsi, pour des cellules cultivées à 2D sans contraintes compressives, nous obtenons une valeur de diffusion moyenne qui vaut  $0,55 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

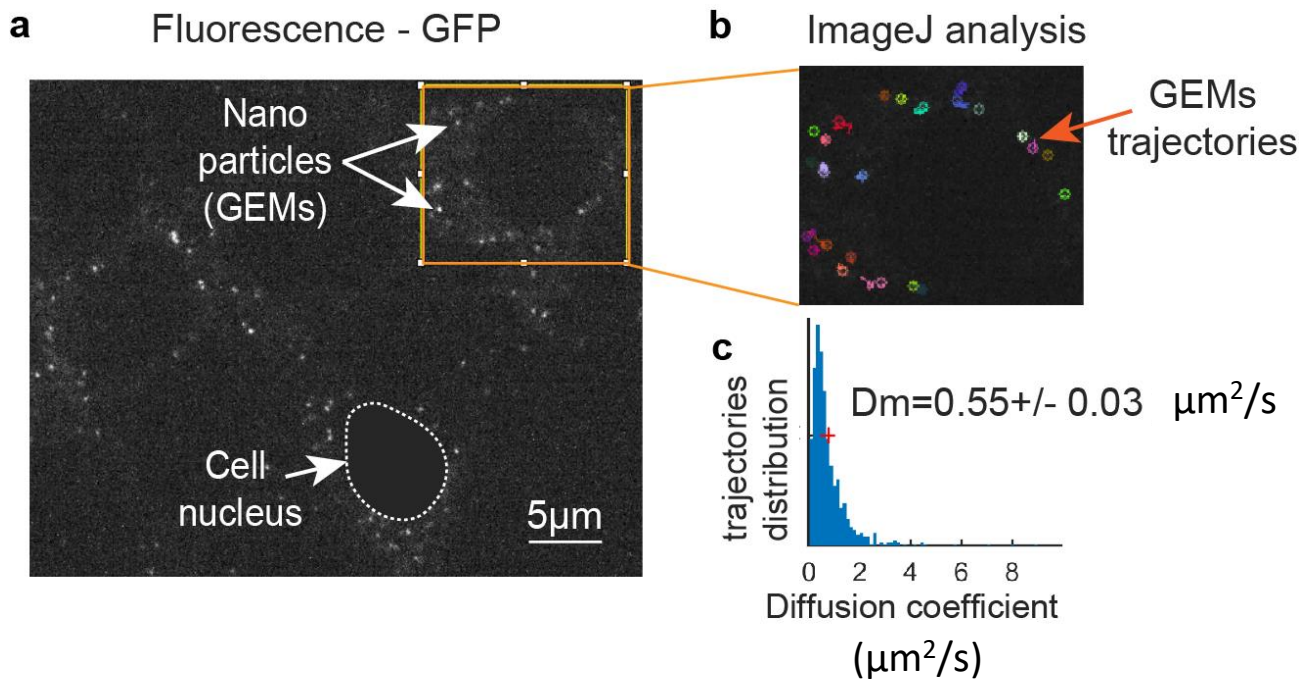


Figure 64-a. Image en GFP des nanoparticules (GEMs) dans le cytoplasme des cellules cultivées à 2D. b. Analyse des trajectoires par le plugin « mosaïc » de imageJ. c. Graphique présentant la distribution des coefficients de diffusion mesurées à partir des trajectoires identifiées par le plugin « Mosaic ».

Il est assez simple de visualiser les GEMs qui diffusent dans le cytoplasme des cellules cultivées à 2D. En revanche, pour des sphéroïdes, nous allons voir que nous ne pouvons pas imager aussi facilement les GEMs en raison de leur forme 3D, mais aussi de la limitation de la profondeur de champ.

### b. Résultats à 3D

La structure mécanique mise en évidence lors des simulations précédentes relate d'une augmentation de la pression de croissance dans un sphéroïde. En mesurant la diffusion des nanoparticules dans les cellules en fonction de leur position dans le sphéroïde, nous allons pouvoir mettre en lien la variation de l'encombrement macromoléculaire en fonction de la pression de croissance obtenue à partir des simulations.

Dans un sphéroïde, nous sommes capables d'imager les GEMs sur une profondeur de 30µm. Au-delà de cette épaisseur, les images sont trop bruitées pour être exploitées. Sur la Figure 65, nous pouvons observer une schématisation de l'observation d'un sphéroïde faite tranche par tranche avec un exemple d'image tirée d'un film de diffusion sur laquelle les nanoparticules fluorescentes apparaissent.

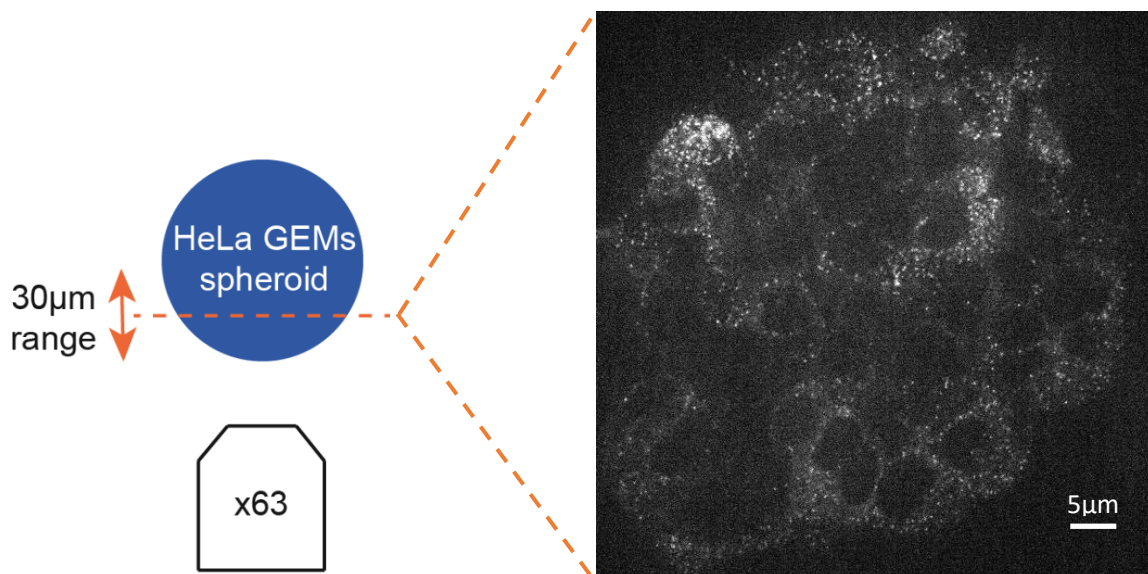


Figure 65 - Schéma de l'imagerie des GEMs

Sur la Figure 66, on peut voir les résultats des mesures du coefficient de diffusion des nanoparticules présente dans des cellules en fonction de leur position le long du rayon du sphéroïde. Tout d'abord, nous avons remarqué que la valeur mesurée sur les bords du sphéroïde ( $x=50\mu\text{m}$ ) est identique à celle obtenue pour des cellules cultivées à 2D sans contraintes compressives sur un substrat rigide ( $0,55\mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Ce résultat est intéressant en soi : les cellules du bord du sphéroïde sont « tendues » par la tension de surface, et il semblerait que cette tension soit en effet large pour les cellules, et similaire à ce qu'elles expérimentent sur un substrat rigide comme du plastique.

On peut également observer que le coefficient de diffusion diminue à mesure que nous nous rapprochons du centre du sphéroïde. Plus précisément, nous obtenons un gradient de diffusion allant de  $0,55\mu\text{m}^2/\text{s}$  pour une cellule présente au bord du sphéroïde à  $0,3\mu\text{m}^2/\text{s}$  pour une cellule proche du centre du sphéroïde ( $x=22\mu\text{m}$ ), soit une diminution de  $0,1\mu\text{m}^2/\text{s} / 10\mu\text{m}$  vers le centre. Nous ne pouvons pas imager plus profondément dans le sphéroïde, ce qui nous limite dans l'estimation de la valeur du coefficient de diffusion plus au centre, notamment, nous ne savons pas si ce dernier sature ou continue de diminuer vers le centre.

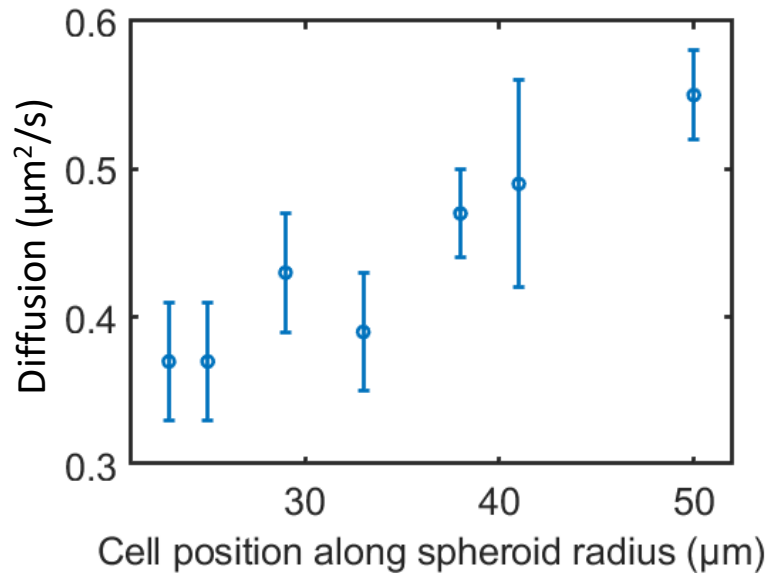


Figure 66 - Diffusion des nanoparticules (GEMs) dans le cytoplasme des cellules du centre vers le bord du sphéroïde.

Au centre du sphéroïde, la diffusion étant plus lente que sur les bords, elle correspond à un état d'encombrement macromoléculaire dans le cytoplasme des cellules plus important à cet endroit. Or, nous avons également montré que les cellules qui constituent les sphéroïdes sont de taille homogène. Ces résultats suggèrent donc qu'à taille égale, une cellule présente au centre du sphéroïde expérimentera un encombrement plus fort qu'une cellule se développant en périphérie.

A présent, si l'on considère la simulation numérique de la partie précédente, nous pouvons mettre en lien les valeurs des coefficients de diffusion mesurées dans le sphéroïde à différentes positions avec les valeurs des pressions de croissance correspondantes (voir Figure 67).

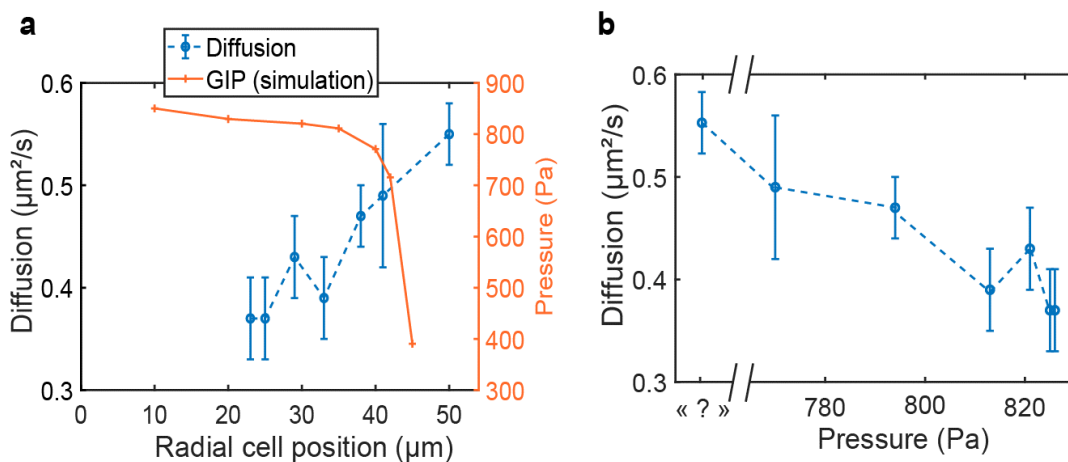


Figure 67 - Combinaison des résultats de simulation pour un sphéroïde libre de 100μm de diamètre en fonction de la diffusion mesurée à partir des GEMs dans le cytoplasme des cellules.

Sur le graphique de la Figure 67a, nous pouvons observer que le gradient de diffusion est inversé par rapport au gradient de pression obtenu lors des simulations. Ainsi, nous observons une diminution de la diffusion à mesure que la pression de croissance augmente lorsque l'on se place au centre du sphéroïde. Autrement dit, plus la pression de croissance est forte, plus l'encombrement macromoléculaire dans le cytoplasme de la cellule est important. La pression de croissance étant calculée à partir du modèle d'une cellule doublant son volume, cette valeur est surestimée dans le cas des cellules commençant tout juste à se déformer. Néanmoins, cela nous donne une idée de la dynamique entre diffusion et pression pour des valeurs qui correspondent à des déformations maximales.

Nous pouvons également visualiser sur la Figure 67b les valeurs expérimentales de diffusion tracées en fonctions des valeurs de pressions de croissance. Lorsque la pression de croissance est d'environ 825Pa, le coefficient de diffusion des GEMs avoisine les  $0,35\mu\text{m}^2/\text{s}$ . On peut voir que, dans notre modèle, une trentaine de Pascals de moins suffisent à faire passer la diffusion à environ  $0,47\mu\text{m}^2/\text{s}$  (point à  $P=795\text{Pa}$ ). Cela suggèrerait que l'encombrement dans la cellule est très sensible à la pression de croissance qu'elle développe pour croître : nous discuterons en perspective ce point, car il est probable que la pression de croissance soit sous-estimée dans nos simulations. Enfin, il serait très intéressant de connaître la valeur de la pression de croissance au bord du sphéroïde (valeur marquée par un « ? » sur le graphique présenté en (b)) qui est en réalité complexe à déterminer. Cela pourrait nous permettre de connaître quelle est la pression de croissance pour laquelle une cellule présente un coefficient de diffusion moyen, et donc un encombrement similaire à celui mesuré dans le cas de cellules cultivées à 2D sans contraintes ( $0,55\mu\text{m}^2/\text{s}$ ).

Pour aller plus loin dans cette réflexion sur la structuration des sphéroïdes, nous avons voulu collecter des données sur la prolifération des cellules. Celle-ci dépend-elle de la position de la cellule dans le sphéroïde, comme la diffusion ? Si tel est le cas, est-elle une conséquence du gradient de pression présent dans les sphéroïdes ?



## 4. Cycle cellulaire

Afin de caractériser la prolifération des cellules dans les sphéroïdes, nous avons réalisé des expériences de marquage par immunofluorescence à partir de la protéine Ki-67. Ki-67 est une protéine nucléaire présente dans les cellules prolifératrices. Comme on peut l'observer sur la Figure 68 (images provenant de l'article de Solovjeva *et al.*<sup>176</sup>), elle est exprimée durant toutes les phases du cycle cellulaire sauf la phase de quiescence G0.

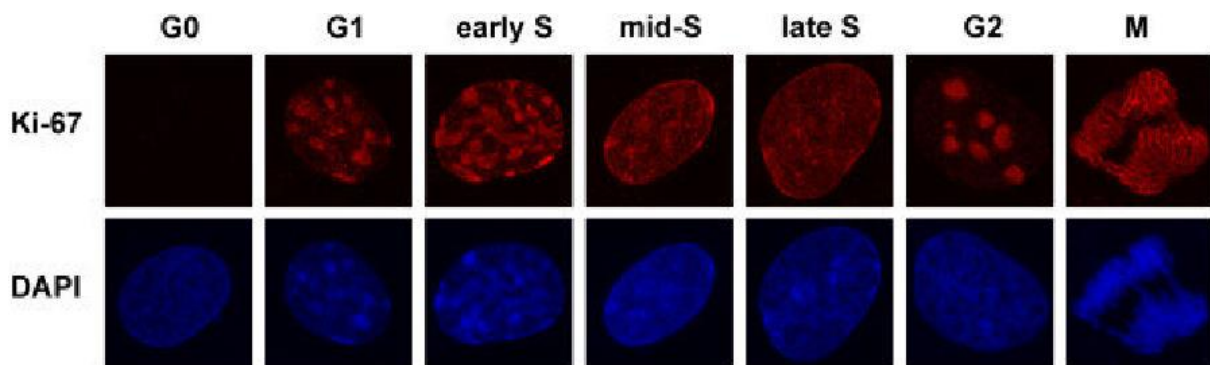


Figure 68 - Figure adaptée et tirée de l'article de Solovjeva *et al.*,<sup>176</sup>. Elle représente les marquages de la protéine Ki-67 et du DAPI pour différentes phases du cycle cellulaire.

Dans la littérature, les analyses faites à partir du marquage de la protéine Ki-67 décompte le nombre de cellules positives (noyau présentant un signal en fluorescence) versus le nombre de noyaux négatifs (aucun signal). Nous avons observé lors de l'imagerie des sphéroïdes, que toutes les cellules étaient positives, ce qui suggère donc qu'elles sont toutes en phase de prolifération. Il a fallu trouver une autre méthode pour différencier les cellules dans le sphéroïde. La protéine Ki-67 forme des *puncta* plus ou moins diffus lorsqu'elle est exprimée en phase G1, en début de phase S ou encore en phase G2. Ces trois phases semblent difficiles à distinguer avec ce marqueur. En revanche, il est très facile de repérer les cellules en cours de division (phase M), et, dans une moindre mesure, la phase S. L'expression de Ki-67 pendant la mitose est concentrée autour des chromosomes qui sont condensés et qui commencent à se séparer. Nous avons ainsi décidé de compter le nombre de cellules en phase M (Figure 69a) et de calculer leurs positions par rapport au centre du sphéroïde. Notons que les sphéroïdes utilisés étaient de 200 $\mu$ m de diamètre car les marquages sur les sphéroïdes de 100 $\mu$ m ce sont révélés être trop complexe : les sphéroïdes étant à la limite d'être visible à l'œil nu, ils ont été aspirés lors des nombreuses étapes de rinçage et de changement de milieu. Cependant, nous supposons

que le gradient de pression est similaire au bord du sphéroïde, que celui soit de  $100\mu\text{m}$  ou de  $200\mu\text{m}$  de diamètre, comme le suggère le résultat des simulations précédentes. A partir des résultats obtenus pour les sphéroïdes de  $200\mu\text{m}$ , la position de la cellule en mitose a été normalisée par rapport au rayon du sphéroïde. Les résultats sont présentés sur la Figure 69 :

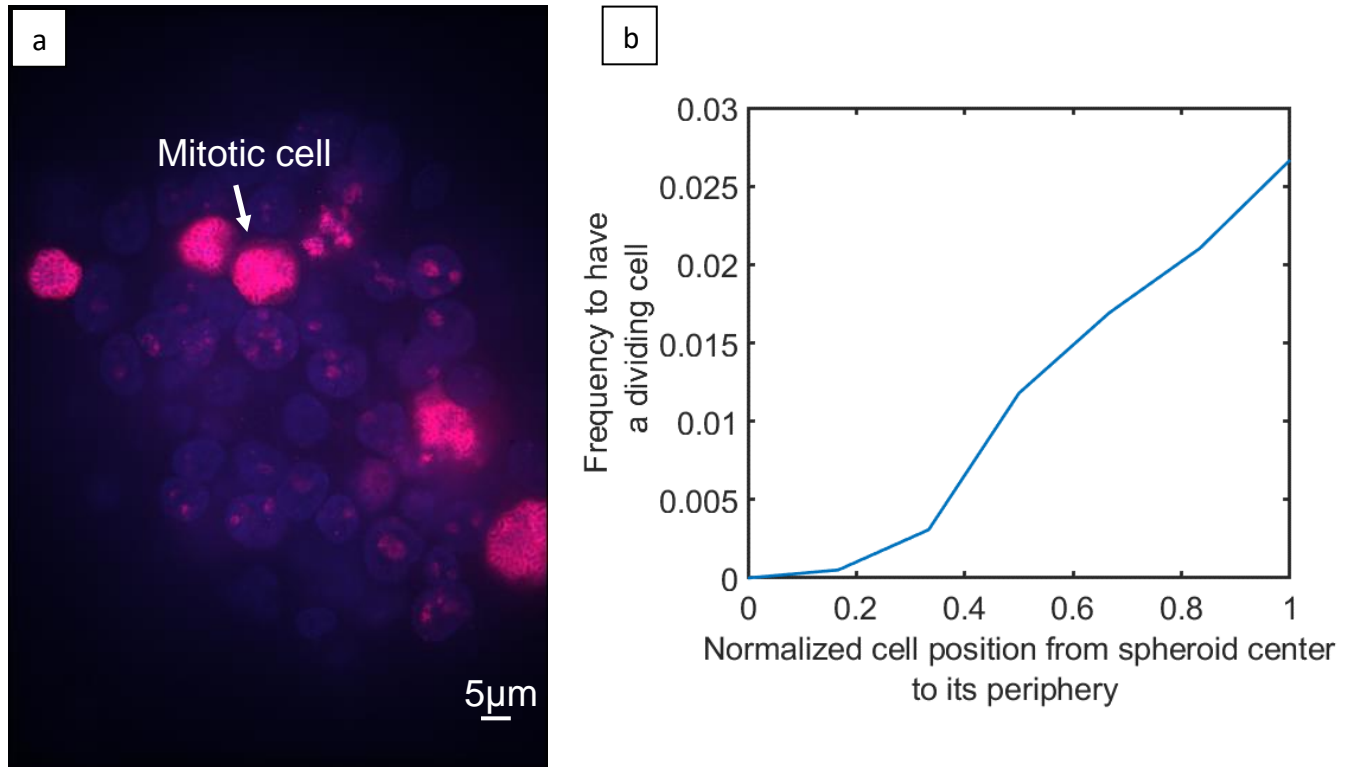


Figure 69 - a. Exemple de l'expression de Ki-67 au niveau des cellules constituant la première couche externe du sphéroïde. b. Probabilité d'expression de Ki-67 en fonction de la position de la cellule du centre vers l'extérieur du sphéroïde.

Nous avons collecté les données à partir de 10 sphéroïdes, et calculé la distribution des cellules en division en fonction de leur position par rapport au centre du sphéroïde. Nous pouvons voir sur la Figure 69b qu'il y a une forte probabilité d'avoir une cellule en division en périphérie ( $x=1$ ) et que cette probabilité décroît lentement à mesure que l'on se rapproche du centre du sphéroïde ( $x=0$ ).

Afin de comparer les dynamiques entre la probabilité d'avoir une cellule en division et l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de la position de la cellule le long du rayon, ces deux variables ont été tracées sur un même graphique (voir Figure 70). Rappelons ici que les mesures de diffusion ont été obtenues à partir de sphéroïdes d'une centaine de micromètres tandis que les expériences de marquages par immunofluorescences ont été faites à partir de plus gros sphéroïdes (environ  $200\mu\text{m}$ ).

Les résultats suggèrent une dynamique similaire lorsque la cellule est proche du bord ( $0,75 < x < 1$ ). Nous pouvons observer qu'une forte probabilité de division est associée à un coefficient de diffusion rapide ( $0,55 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ).

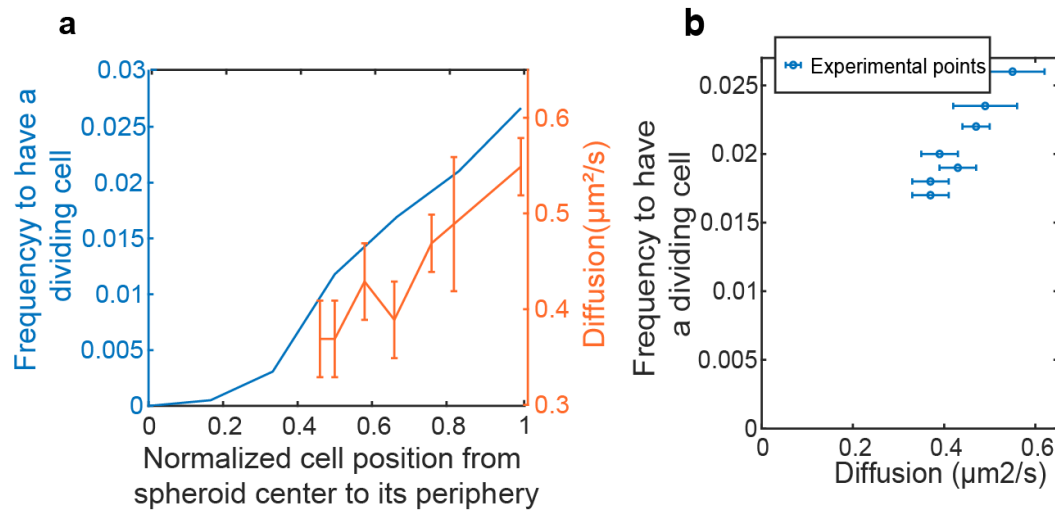


Figure 70 - a. Graphique montrant la fréquence d'avoir une cellule en division ainsi que la mesure du coefficient de diffusion en fonction de la position de la cellule dans le sphéroïde. b. Graphique présentant la fréquence d'avoir une cellule en division en fonction de la diffusion des nanoparticules à l'intérieur de son cytoplasme.

Le graphique de la Figure 70b représente comment évolue la probabilité d'avoir une cellule en division en fonction de son encombrement macromoléculaire. La plus forte probabilité d'avoir une cellule en division est obtenue pour un coefficient de diffusion de  $0,55 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Pour le plus faible coefficient de diffusion mesurée dans le sphéroïde ( $0,37 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) la probabilité d'avoir une cellule en division diminue grandement.

Pour résumer, les cellules les moins susceptibles de se diviser sont présentes au centre du sphéroïde. Dans notre modèle, elles ont une pression de croissance élevée ainsi qu'un fort encombrement moléculaire. Ces résultats sont à mettre en relation avec d'autres expériences réalisées dans l'équipe par Baptiste Alric. Durant sa thèse, Baptiste a montré chez les levures que la croissance confinée impliquait l'émergence de pression de croissance associée à une augmentation de l'encombrement et à une diminution de la division cellulaire<sup>59</sup>. Les résultats que nous trouvons dans cette partie semblent confirmer, chez les cellules mammifères, cette tendance.

Maintenant que nous avons mis en relation la pression de croissance avec l'encombrement macromoléculaire ainsi que la probabilité d'avoir une cellule en division en fonction de sa position dans un sphéroïde libre, nous allons étudier comment ces paramètres évoluent lorsque le sphéroïde est inclus dans un environnement solide (sphéroïde confiné).

## Partie 2 : Comment se différencie la structure mécanique, le gradient de division ainsi que l'encombrement d'un sphéroïde libre avec ceux d'un sphéroïde confiné ?

---

Comme nous l'avons vu précédemment, les sphéroïdes sont des modèles cancéreux très utilisés pour reproduire la structure tri-dimensionnelle des microtumeurs. Cependant, si l'on va un cran plus loin, les microtumeurs évoluent dans un espace limité par leur micro environnement, qui peut être caractérisé par une rigidité plus ou moins forte, ce qui a une grande influence sur la progression tumorale. En travaillant sur des sphéroïdes qui évoluent dans un environnement confiné, nous ajoutons au modèle un contexte mécanique pour tenter de reproduire celui qui est présent *in vivo*. Nous pouvons ainsi étudier l'impact des contraintes compressives induites par la croissance des cellules dans un espace confiné.

### 1. Résultats des simulations pour un sphéroïde confiné

---

Comment évolue la pression de croissance développée par une cellule dans un sphéroïde confiné ? C'est la question à laquelle nous avons tenté de répondre en reprenant les simulations précédentes. Pour ce faire, nous avons imposé un déplacement nul sur l'ensemble de la surface extérieure du sphéroïde.

Sur la Figure 71, on peut observer les deux courbes de pressions de croissance correspondantes à un sphéroïde libre (courbe rouge) et un sphéroïde confiné (courbe bleue).

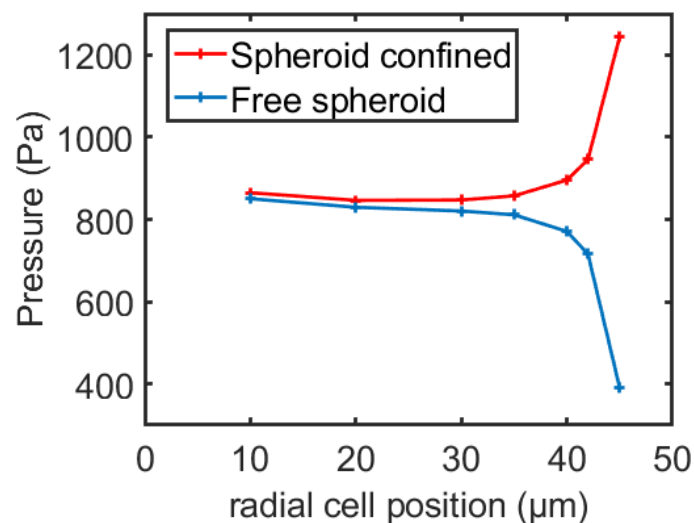


Figure 71 - Superposition des simulations obtenues dans le cas d'un sphéroïde confiné (courbe rouge) et d'un sphéroïde libre (courbe bleue).

Premièrement, nous pouvons observer que les deux gradients de pressions sont opposés : pour un sphéroïde confiné, il sera plus difficile de se déformer en bordure du sphéroïde (pression de croissance proche de 1245Pa) qu'au centre (pression de 850Pa), contrairement au cas d'un sphéroïde libre.

Les valeurs de la pression de croissance à 10 $\mu$ m du centre sont proches dans les deux cas, confiné et libre : il y a seulement une différence de 15Pa. Peut-être convergeraient-elles si nous pouvions simuler cette zone. A cet endroit, la cellule est surtout contrainte par l'élasticité du sphéroïde, qui est de 2,4kPa. En revanche, dans le cas d'un sphéroïde confiné, une cellule en bordure sera contrainte par une rigidité « infinie » : elle ne pourra pas déformer le sphéroïde en périphérie.

Dans le cas d'un sphéroïde libre, nous avons vu qu'il était difficile d'estimer la valeur de la pression de croissance au bord, mais que celle-ci était probablement en lien avec la pression de Laplace. Pour un sphéroïde confiné, sa forme étant limitée par la rigidité du micro environnement qui l'entoure, celui-ci n'est pas libre de se déformer : dans ce cas, nous pouvons supposer que la tension de surface n'est plus mise en jeu.

Pour conclure, les valeurs de pression de croissance sont plus fortes dans le cas d'un sphéroïde confiné que dans le cas d'une croissance libre, et particulièrement au bord du sphéroïde. Comment ce gradient de pression influe-t-il sur l'encombrement macromoléculaire présent dans le cytoplasme des cellules ?

## 2. Evolution de l'encombrement macromoléculaire dans un sphéroïde sous pression

---

Dans l'introduction, nous avons pu voir que l'augmentation de la pression induite par la croissance confinée des levures dans des chambres microfluidiques était accompagnée d'une augmentation de l'encombrement macromoléculaire dans les cellules<sup>59</sup>. Nous avons alors soupçonné un effet similaire chez les cellules animales en réponse à la pression de croissance.

Comme pour les levures, nous avons créé des chambres de culture permettant la croissance confinée de plusieurs sphéroïdes en parallèle (voir chapitre 2). Nous avons profité du fait que l'on puisse réaliser de l'imagerie en haute résolution dans le dispositif pour faire une étude sur l'encombrement macromoléculaire des cellules dans un sphéroïde confiné.

Un exemple de projection temporel de l'ensemble des trajectoires des GEMs ayant diffusées pendant 500ms dans une cellule d'un sphéroïde libre (pression nulle) est représenté sur la Figure

72a. On peut observer que les trajectoires sont très longues, ce qui signifie que les GEMs ont pu diffuser sur de grandes distances. En revanche, pour les cellules d'un sphéroïde confiné (image de droite, correspondant à  $P=2,5\text{kPa}$ ), les trajectoires des nanoparticules pour un temps similaire sont en comparaison beaucoup plus courtes.

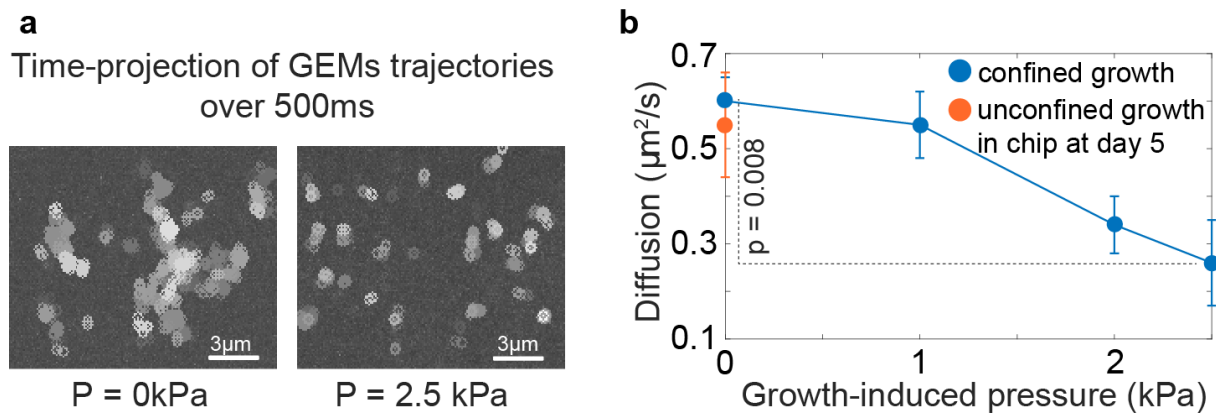


Figure 72 - a. Projection de la trajectoire des GEMs sur une période de 500ms. b. Graphique représentant la diffusion en fonction de la GIP dans les chambres de culture.

Le graphique de la Figure 72b représente l'évolution du coefficient de diffusion mesurée dans des cellules situées en périphérie du sphéroïde confiné (dessous de la chambre de culture), en fonction de la pression induite par la croissance des cellules, mesurée grâce à la membrane présente dans les chambres de culture. Nous pouvons d'abord observer la diminution de la diffusion des nanoparticules à mesure que la pression induite par la croissance des cellules augmente dans la chambre. Comme pour les levures, ce résultat suggère que l'encombrement intracellulaire augmente lorsque la prolifération des cellules est confinée et que la pression induite par la croissance s'accumule dans la chambre. Notons que la condition contrôle (pression nulle dans la chambre) correspond à un confinement partiel du sphéroïde. Celui-ci peut se développer seulement dans une direction, ce qui s'apparente à une culture faite dans un dispositif semi-ouvert (open-facing device<sup>177</sup>). Dans ce cas, il n'y a pas de changement de diffusion des nanoparticules, ce qui appuie le fait que seul un confinement total a un impact sur l'encombrement intracellulaire. Ces résultats obtenus grâce au dispositif ont fait l'objet d'une publication dans le journal Lab on a Chip<sup>178</sup>.

Comme nous l'avons vu dans la partie 1 de ce chapitre, lorsque la pression est nulle (courbe bleue sur la Figure 73b ci-contre), la diffusion des GEMs diminue lorsque les cellules sont de plus en plus proches du centre. Nous avons initié le même type de mesure dans le cas d'une

croissance confinée pour savoir comment évolue l'encombrement pour des cellules localisées à différents positions dans le sphéroïde.

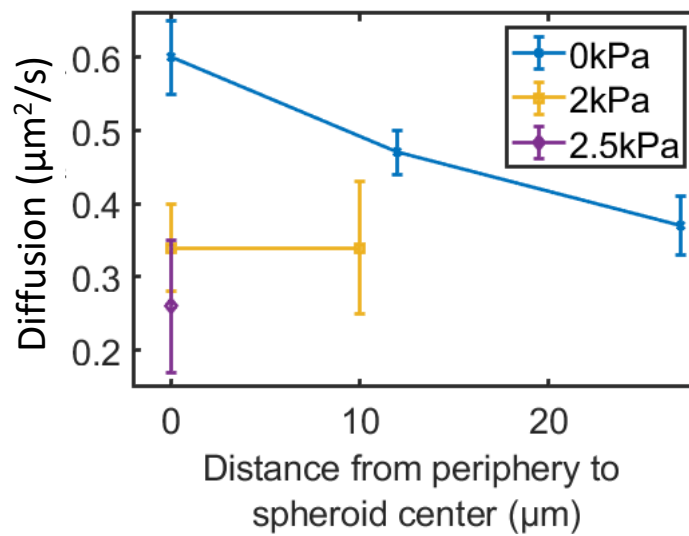


Figure 73 - Graphique présentant les mesures de diffusion réalisées à différents z dans le sphéroïde, dans le cas d'une pression nulle, d'une pression de 2kPa et d'une pression de 2,5kPa.

Pour une pression de croissance valant 2kPa (courbe jaune), la diffusion reste identique ( $0,34\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) pour des cellules comprises entre 0 et  $10\mu\text{m}$  à partir de la bordure du sphéroïde. Nous pouvons nous demander si l'encombrement dans les cellules tend à s'homogénéiser dans l'ensemble du sphéroïde (disparition du gradient de diffusion) à mesure que la pression de croissance augmente. A 2,5kPa, la diffusion vaut environ  $0,26\mu\text{m}^2/\text{s}$  à  $z=0\mu\text{m}$ . Elle est plus de deux fois plus lente que la valeur de diffusion mesurée au bord d'un sphéroïde sans pression (entre  $0,55$  et  $0,6\mu\text{m}^2/\text{s}$ ).

Les mesures de diffusion faites à partir des GEMs sont très sensibles au bruit lors des expériences. Il arrive parfois qu'il y ait du photoblanchiment sur un film (photo-bleaching) dû à une exposition trop longue des GEMs. Même si l'exposition est courte (de l'ordre de quelques secondes), la puissance du laser utilisée étant maximale, j'ai souvent observé ce phénomène. A cela s'ajoute aussi le fait que plus on image dans l'épaisseur du sphéroïde, moins la résolution est bonne. Par ailleurs, l'expression même des GEMs d'une cellule à l'autre peut être différente : il y a des cellules qui expriment un nombre trop important de nanoparticules (même si ce problème est moins courant) ce qui empêche l'identification des trajectoires lors de l'analyse. C'est pour ces différentes raisons que plusieurs films n'ont pas pu être analysés. D'autres expériences en pression permettraient de compléter la caractérisation du sphéroïde dans son ensemble. Nos résultats ne nous permettent donc pas de conclure quant à la présence

d'un potentiel gradient d'encombrement sous confinement qui serait corréluer au gradient de pression de croissance.

L'encombrement semble être de plus en plus important à mesure que la valeur de la pression de croissance augmente. Nous avons vu que dans un sphéroïde libre, une forte valeur de pression de croissance était associée à un encombrement maximal de la cellule et une probabilité de division très faible. Nous allons donc étudier l'influence de la pression de croissance sur la régulation du cycle cellulaire dans le cas d'un sphéroïde confiné.

### 3. Régulation du cycle cellulaire d'un sphéroïde sous pression

Grâce au dispositif microfluidique, nous avons pu étudier une autre lignée cellulaire, la lignée A338 (issue du cancer du pancréas et présentant pour mutation principale une mutation activatrice du gène KRas<sup>G12D</sup>) transfectée avec le vecteur FUCCI. Ce dernier permet de marquer les noyaux des cellules en fonction de leur phase dans le cycle cellulaire. Malheureusement, nous n'avons ni pu utiliser le marquage FUCCI sur la lignée HeLa-GEMS, ni réussi à faire un marquage de Ki-67 satisfaisant sur cette dernière.

Sur la Figure 74a, on peut distinguer les trois couleurs correspondantes aux phases que l'on peut identifier à partir de la lignée cellulaire A338-FUCCI (phase G2/M : orange, phase G1 : verte, phase S : rouge). Il y a également deux illustrations montrant des sphéroïdes issus de cette lignée : l'un est présent dans une chambre de culture à pression nulle (image de gauche) et l'autre est dans une chambre où la pression de croissance atteint 1,5kPa. On peut également observer le déplacement du capteur de pression entre les deux images.

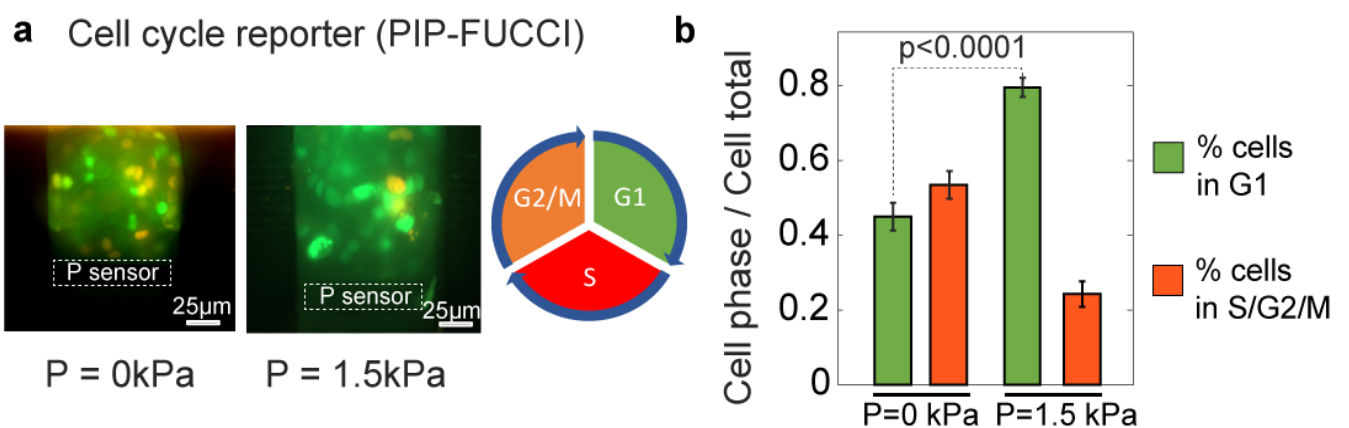


Figure 74: a. Images de deux sphéroïdes localisés dans les chambres de culture du dispositif : l'un ne subit aucune pression de croissance et l'autre est soumis à une pression de 1,5kPa. b. Histogramme montrant la distribution des cellules dans les phases G1 et S/G2/M du cycle cellulaire. Les cellules s'accumulent en G1 à mesure que la GIP augmente.



Le diagramme en barres montrant la distribution des cellules en fonction de leur phase dans le cycle cellulaire est montré sur la Figure 74b. Nous avons pu distinguer les cellules en phase G1 des cellules présentes en phase G2/M/S du cycle cellulaire. Dans un sphéroïde, la distinction entre les phases G2/M et S est très difficile car les couleurs de ces deux phases sont très proches (orange et rouge). Par manque de certitude, nous avons donc choisi de ne pas les différencier lors de l'analyse.

Lorsque les sphéroïdes ne sont pas confinés dans les chambres de culture, les résultats montrent un nombre légèrement plus important de cellules (55%) présentes dans les phases S/G2 et M du cycle cellulaire. En revanche, lorsque la pression de croissance augmente jusqu'à 1.5kPa dans la chambre, les résultats montrent une forte majorité (à hauteur d'environ 80%) de cellules présente dans la phase G1 du cycle cellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans la littérature<sup>41,179,40,180,181</sup>, qui montrent l'impact de la pression de croissance sur la prolifération et plus précisément une accumulation de cellules en phase G1 du cycle cellulaire.

## Partie 3 : Conclusion et perspectives

### 1. Conclusion

---

Nous avons pu réaliser une étude préliminaire sur la pression de croissance qui existe au sein des sphéroïdes. En collaborant avec Hélène Delanoë, maitresse de conférences à l'ILM (Institut Lumière Matière de Lyon) nous avons pu réaliser des simulations modélisant la croissance d'une cellule en fonction de sa position dans le sphéroïde. Ces simulations, bien que simples conceptuellement, nous permettent de proposer des hypothèses sur l'émergence de la pression de croissance au sein d'un sphéroïde.

Dans le cas d'un sphéroïde libre, les simulations révèlent la présence d'un gradient de pression le long du rayon du sphéroïde, qui faciliterait très certainement la division des cellules localisées au bord du sphéroïde, puisqu'elles ont une pression de croissance plus faible que celles présentes au centre. Les simulations ne permettent pas d'obtenir la valeur de la pression de croissance au bord du sphéroïde. La pression à cet endroit est dure à estimer en raison de la présence de la tension de surface, qui tend à maintenir la forme sphérique du sphéroïde et qui impacte certainement la pression de croissance développée par les cellules, particulièrement au bord du sphéroïde. La tension de surface étant compensée par la pression de Laplace à

l'équilibre, cette pression doit être également développée par les cellules lors de leur phase de croissance. C'est pourquoi nous avons voulu estimer sa valeur en réalisant des expériences de fusion de sphéroïde. Nous avons obtenu une pression de Laplace d'environ 36Pa, ce qui est négligeable par rapport à l'ordre de grandeur de la pression de croissance calculée dans les simulations, qui est de plusieurs centaines de Pascals.

Par ailleurs nous avons pu faire varier les paramètres de la simulation (taille du sphéroïde et élasticité) pour comprendre leur influence sur le gradient de pression. Grâce à cette simulation nous avons pu comparer le gradient de pression obtenu pour un sphéroïde de 100 $\mu\text{m}$  et 200 $\mu\text{m}$  de diamètre. Nous avons ainsi trouvé que le gradient était de même amplitude dans les deux cas. En comparant l'influence de l'élasticité du sphéroïde sur la simulation, nous avons pu voir que le gradient de pression était d'une amplitude de plus en plus faible lorsque le module de Young diminue. Les résultats suggèrent même la disparition du gradient de pression pour des sphéroïdes très « mous » (résultats obtenus pour  $E=100\text{Pa}$ ).

Afin de comprendre l'impact de la pression de croissance sur l'encombrement macromoléculaire, nous avons réalisé des mesures de diffusion en cellule unique, tranche par tranche, sur des sphéroïdes libres. Les résultats montrent un encombrement intracellulaire qui s'accroît pour les cellules se trouvant de plus en plus proche du centre. C'est également à cet endroit que la pression de croissance atteint un maximum. Si l'on met en lien les simulations avec les valeurs de diffusions mesurées dans un sphéroïde, on trouve qu'un coefficient de  $0,3\mu\text{m}^2/\text{s}$  est obtenu pour une pression de 820Pa. Ce résultat semble incohérent avec celui obtenu expérimentalement pour un sphéroïde confiné où la valeur du coefficient de diffusion au bord du sphéroïde vaut également  $0,3\mu\text{m}^2/\text{s}$  pour une pression de 2,5kPa. Nous avons émis plusieurs hypothèses pour expliquer ce résultat obtenu à partir des simulations :

- L'élasticité du sphéroïde fixé dans les simulations n'est peut-être pas la bonne ( $E=2400\text{kPa}$ ). Il faudrait réaliser des mesures supplémentaires afin de confirmer la valeur du module de Young. Par ailleurs, nous avons réalisé d'autres simulations en faisant varier le module de Young du sphéroïde afin de trouver une pression de croissance au centre qui se rapproche de 2,5kPa. Pour un module de Young de 6kPa, nous obtenons une valeur au centre qui vaut 2,2kPa. La simulation est présentée ci-dessous :

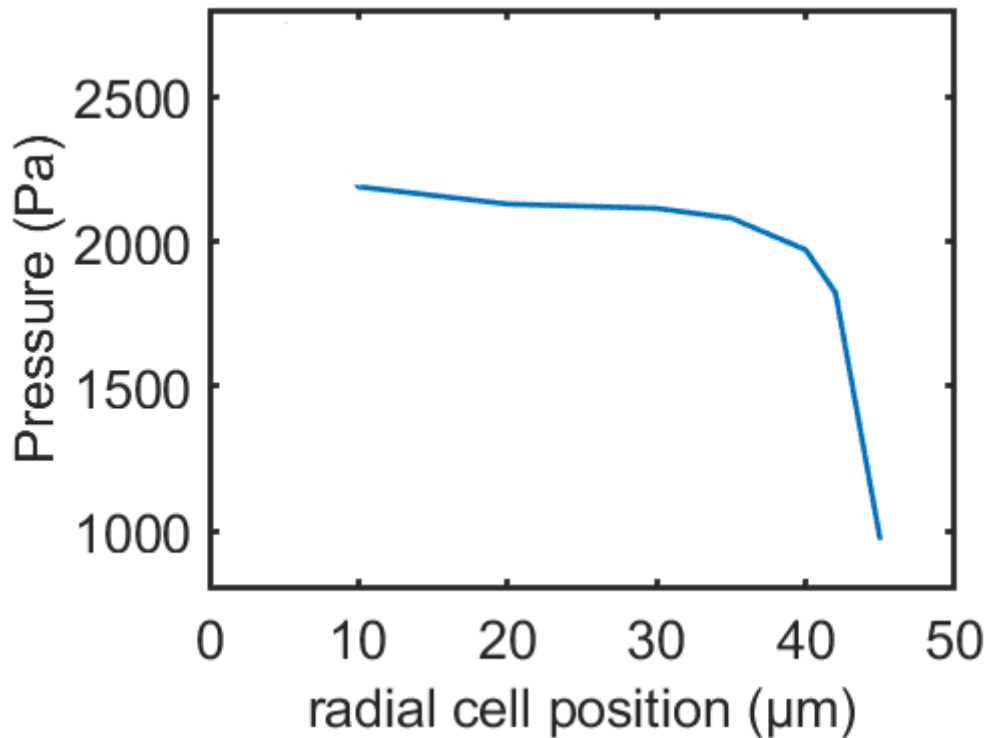


Figure 75 - Simulation obtenue pour E=6kPa.

- La tension de surface au bord du sphéroïde rajoute peut-être une force au bord qui augmente le gradient de pression de croissance. Des simulations plus complexes dans lesquelles la tension de surface est intégrée aux paramètres permettraient de mieux comprendre son influence sur la pression de croissance des cellules au sein du sphéroïde.
- Le cas d'un sphéroïde confiné n'est peut-être pas comparable avec celui d'un sphéroïde libre au niveau de la variation de la diffusion par rapport à la pression de croissance, en particulier parce que la tension de surface dans un sphéroïde confiné n'est probablement plus mise en jeu alors qu'elle joue peut-être un rôle dans la structuration mécanique des sphéroïdes.
- Enfin, nous avons réalisé des simulations pour lesquelles nous étudions la croissance d'une seule cellule dans un sphéroïde. Nous allons voir en perspective que la présence d'autres cellules peut augmenter considérablement la valeur de la pression de croissance des cellules au sein du sphéroïde.

Grâce aux marquages de la protéine Ki-67, nous avons pu étudier le lien entre la pression de croissance et la prolifération des cellules. Nous avons observé une forte probabilité de trouver une cellule en division au bord du sphéroïde, ce qui dans les simulations est associé à une pression de croissance faible ainsi qu'un coefficient de diffusion rapide (cellule peu encombrée).

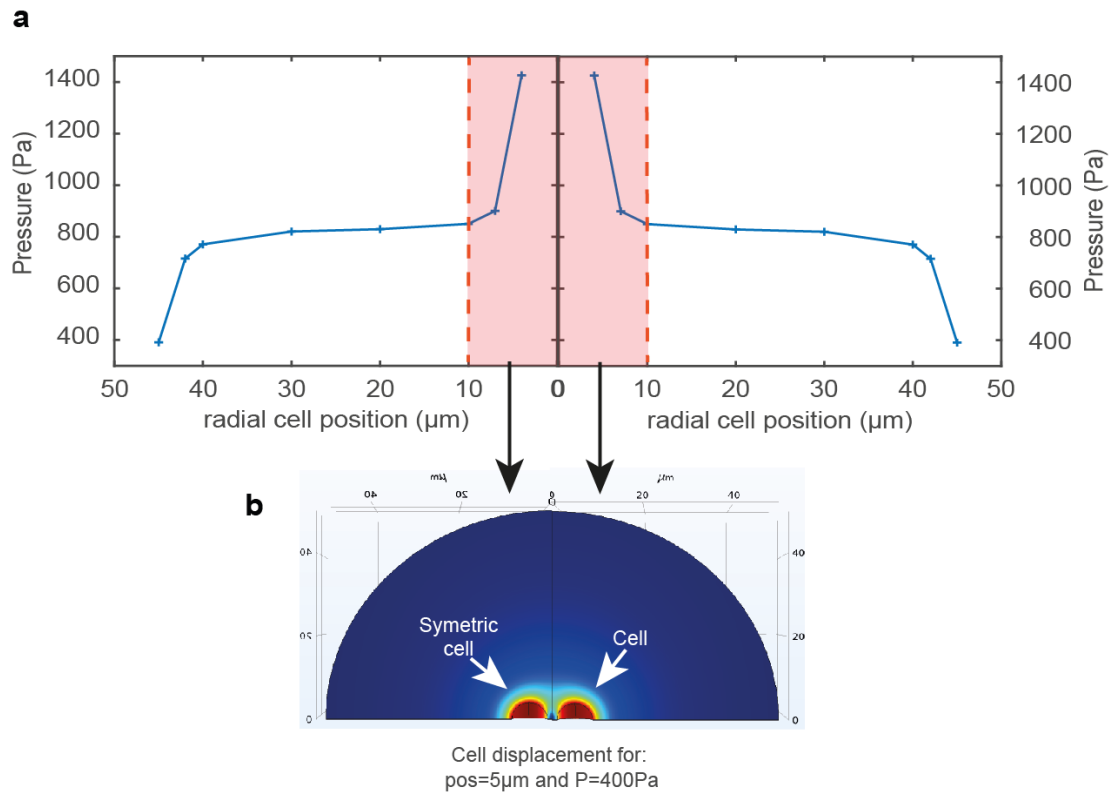
Enfin, dans le cas d'un sphéroïde ayant une croissance confinée (s'il est par exemple inclus dans un hydrogel) le gradient de pression s'inverse : il devient alors plus difficile pour une cellule de se développer en périphérie du sphéroïde qu'en son centre. Les résultats obtenus à partir de la mesure du coefficient de diffusion suggèrent que les cellules sont de plus en plus encombrées à mesure que la pression de croissance augmente. En effet, pour croître, les cellules produisent des osmolytes et des macromolécules tandis que leur expansion reste limitée, ce qui cause un encombrement intracellulaire important qui limite en retour la croissance de la cellule.

Des résultats sur la prolifération des cellules (marquages de la protéine Ki-67) permettrait de connaître la probabilité qu'une cellule soit en division en fonction de sa position dans le sphéroïde. Cependant, nous avons quand même réussi à obtenir des informations sur la régulation du cycle cellulaire sous pression. Grâce au dispositif microfluidique, nous avons pu montrer qu'il y a une accumulation de cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire à mesure que la pression de croissance augmente dans la chambre.

## 2. Perspectives

---

Les simulations ont été faites à partir de la modélisation d'une seule cellule dans un sphéroïde. Il serait intéressant de savoir comment la pression de croissance est impactée par la croissance simultanée de plusieurs cellules dans le sphéroïde. Si l'on se sert de l'axe de symétrie défini dans le modèle, on peut voir que la cellule modélisée est proche de son symétrique lorsqu'elle se situe à moins de 10 $\mu$ m du centre (voir Figure 76b). Sur le graphique de la Figure 76a, on peut observer comment évolue la dynamique de la pression de croissance lorsqu'une cellule est proche d'une autre ( $x < 10$ ).



**Figure 76 - Pression de croissance développée par une cellule dans un sphéroïde libre, en fonction de sa position le long du rayon.**

Dans le cas présenté ci-dessus, les cellules sont séparées par  $2\mu\text{m}$  lorsqu'elles se situent à  $4\mu\text{m}$  du centre. C'est une distance plutôt grande en regard de la distance intercellulaire mesurée expérimentalement (environ  $1\mu\text{m}$  : voir Dolega *et al.*, 2021<sup>182</sup>), mais c'est la distance minimum pour laquelle nous avons pu obtenir des résultats sans problème de simulation. A  $x=4\mu\text{m}$ , la pression de croissance augmente jusqu'à  $1426\text{Pa}$ , soit 1,5 à 2 fois plus élevée que la pression de croissance mesurée dans le cas d'une cellule unique présente dans un sphéroïde. Ces données suggèrent que si l'on modélise l'ensemble des cellules d'un sphéroïde, la pression de croissance à développer sera encore plus importante, expliquant peut-être la valeur de la diffusion au sein d'un sphéroïde.

Par ailleurs, comme nous l'avons montré dans la partie 1 de ce chapitre, il est possible d'étudier l'accumulation de contraintes résiduelles dans des sphéroïdes en réalisant des incisions le long du rayon de celui-ci. Une perspective intéressante de ce travail serait de retrouver la forme du gradient de pression à partir des images de coupe des sphéroïdes. A la fin de ma thèse, nous avons engagé une collaboration avec Pauline Assemat, chercheuse en biomécanique à l'IMFT, afin d'adapter les méthodes numériques qu'elle propose dans le cadre du projet GSO. Il s'agit de reproduire des simulations d'éléments finies permettant de remonter au champ de contraintes à partir du champ de déformation.

## Chapitre 4 : Impact des contraintes mécaniques sur la dynamique d'infection des virus

---

Les virus oncolytiques représentent une alternative prometteuse dans le traitement des cancers car ils s'attaquent préférentiellement aux cellules cancéreuses sans endommager les cellules saines<sup>183</sup>. Il a également été découvert que certaines cellules cancéreuses infectées relarguent des antigènes viraux et tumoraux qui participent au recrutement des cellules immunitaires sur le site tumoral<sup>184</sup>, ce qui pourrait aider à booster la réponse immunitaire.

Cependant, à notre connaissance, l'efficacité des virus oncolytiques n'a pas encore été étudiée dans le cas du traitement d'une tumeur solide sous l'influence de contraintes mécaniques. En ce qui concerne les contraintes mécaniques de tension, elles peuvent modifier le cytosquelette de la cellule, dont l'organisation du réseau d'actine<sup>185,186</sup>. Or, si le réseau d'actine est déstructuré ou endommagé, cela peut provoquer la formation de petits filaments d'actine (« actin projectile ») qui favorisent la libération des virus en dehors de la cellule<sup>187</sup>. Notons que certains virus sont capables d'altérer eux-mêmes le cytosquelette des cellules, leur permettant de tirer profit de cette déstructuration et relarguer un maximum de virions en dehors de la cellule, comme le virus de la vaccine ou celui de la myxomatose encodant la protéine F11 du virus de la vaccine<sup>187,188</sup>.

Dans le cas du cancer, la rigidification des tissus favorisent la progression tumorale<sup>189,190</sup> et augmentent la résistance aux médicaments<sup>191,192</sup>. Par ailleurs, dans le cas des contraintes mécaniques compressives, celles-ci peuvent entraîner une baisse de la prolifération cellulaire<sup>41,181,42</sup>. Ainsi, les agents anti-cancéreux classiquement utilisés en chimiothérapie qui ciblent les cellules prolifératrices seront moins efficaces si la tumeur est fortement contrainte<sup>42</sup>. Nous avons émis l'hypothèse que le virus qui fait objet de cette étude peut infecter des cellules cancéreuses indépendamment de la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent. Si tel est le cas, il serait un bon candidat pour contourner les limitations rencontrées lors de l'utilisation de certains agents chimiothérapeutiques qui ciblent les cellules prolifératrices.

Nous avons utilisé pour cette étude le virus SG33 qui est un dérivé du virus de la myxomatose. Avec une taille d'environ 160kb<sup>193</sup> (soit 250nm), il figure parmi les virus oncolytiques de grandes tailles. En cela, il serait intéressant d'étudier sa capacité d'infiltration au sein de tumeurs et plus particulièrement de tumeurs sous l'influence de contraintes mécaniques compressives, bien que ce ne soit pas l'objet de cette étude.

Enfin, nous supposons qu'en utilisant la machinerie cellulaire pour se répliquer, les virus oncolytiques sont susceptibles d'occuper un volume grandissant à l'intérieur de la cellule et ainsi d'augmenter l'encombrement macromoléculaire de la cellule hôte. Cette potentielle augmentation de l'encombrement se ferait en parallèle du programme de lyse cellulaire du virus. En ce sens, il serait intéressant d'étudier l'encombrement macromoléculaire des cellules infectées en mesurant le coefficient de diffusion des nanoparticules GEMs qui sont génétiquement exprimées par les cellules de notre lignée HeLa, et de le corrélérer à la réplication virale et à la mort cellulaire. En effet, une étude récente suggère que l'augmentation de l'encombrement durant un choc hyperosmotique pourrait déclencher la mort cellulaire par la voie mitochondriale<sup>194,195</sup>, posant la question du lien entre lyse cellulaire et encombrement macromoléculaire.

Durant ma thèse, nous avons ainsi débuté une collaboration avec Pierre Cordelier, directeur de recherche au CRCT (Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse) et Agathe Redouté, étudiante en thèse dans son équipe, qui étudient le mode de fonctionnement de différents virus oncolytiques, dont le virus SG33 que je présente ci-dessous. Nous avons élaboré un projet qui vise à comprendre comment ce virus oncolytique répond sous l'effet de contraintes mécaniques et quel effet il peut avoir sur la rhéologie cellulaire.

Dans le cadre de ce projet, j'ai pu encadrer deux étudiants : Manaiti Gamblin, étudiant en master PMV (Physique et Mécanique du Vivant) de l'université de Toulouse ainsi que Zeina Chebbo, étudiante en master génomique et protéomique fonctionnelles de l'université de Beyrouth au Liban. Une partie des résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus durant leurs stages. Manaiti a travaillé sur l'impact de la rigidité du substrat sur l'efficacité d'infection du virus. Zeina a quant à elle étudié l'infection des virus oncolytiques en 3D sur des sphéroïdes. Les résultats présentés dans ce chapitre sont très prospectifs, ce projet ayant été initié durant ma dernière année de thèse.

## 1. Le virus SG33, un virus oncolytique dérivé du virus de la myxomatose

---

### a. Le virus de la myxomatose

Le virus de la myxomatose (MYXV) est un grand virus à ADN enveloppé. C'est l'espèce type du genre *Leporipoxvirus* de la famille des *Poxviridae*. Le MYXV est limité aux léporidés et ne

provoque la myxomatose (maladie mortelle) que chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*)<sup>196</sup>. Cependant, des études *in vivo* et *in vitro* ont montrées que le MYXV a un tropisme sélectif pour les cellules cancéreuses en dehors de l'hôte lapin<sup>197</sup>. Le virus se réplique dans les cellules cancéreuses tandis que les cellules saines échappent à l'infection virale. Ce tropisme sélectif fait du MYXV un bon candidat pour le développement de virus oncolytiques dans le but de traiter différents types de cancer. Son large ADN code pour des dizaines de protéines immunomodulatrices qui jouent un rôle majeur dans le tropisme cellulaire et la modulation des réponses immunitaires innées antivirales de l'hôte<sup>198</sup>. Le virus SG33 est un exemple de virus oncolytique dérivé du MYXV, qui a été caractérisé et utilisé dans la recherche<sup>199</sup>.

#### b. Le virus SG33 et le système ANCHOR

Le virus SG33 est un nouveau virus oncolytique prototypique dérivé du virus de la myxomatose de type sauvage (MYXV). Il surpasse la réplication du MYXV et son cycle viral dans des cellules modèles (à la fois au niveau d'une cellule unique et d'une population) a été récemment étudié<sup>199</sup>.

Le système ANCHOR est une nouvelle technique de génie génétique utilisé pour la surveillance en temps réel de la localisation de l'ADN<sup>200</sup>. Il comprend une séquence cible d'ADN (« ANCH ») qui lie les dimères de la protéine « OR » par l'intermédiaire de sites de nucléation. La construction du virus MYXV-ANCHOR est basée sur la recombinaison homologue du plasmide donneur pVmyxlac- ANCHOR et du gène LacZ du virus recombinant MYXV-LacZ (voir Figure 77a)<sup>199</sup>.

Pour cette étude, nous avons utilisé le virus SG33-ANCH. Il possède une construction composée d'OR3 qui est fusionnée à la RFP (« red fluorescent protein », protéine fluorescente rouge), bien que dans cet exemple présenté en Figure 77 ce soit la GFP qui a été fusionnée. Les dimères ORRFP exprimés sont recrutés pour former un grand complexe nucléoprotéique métastable sur la séquence ANCH, qui crée un foyer fluorescent dans la cellule, permettant ainsi de quantifier la quantité d'ADN viral en direct (voir Figure 77b).



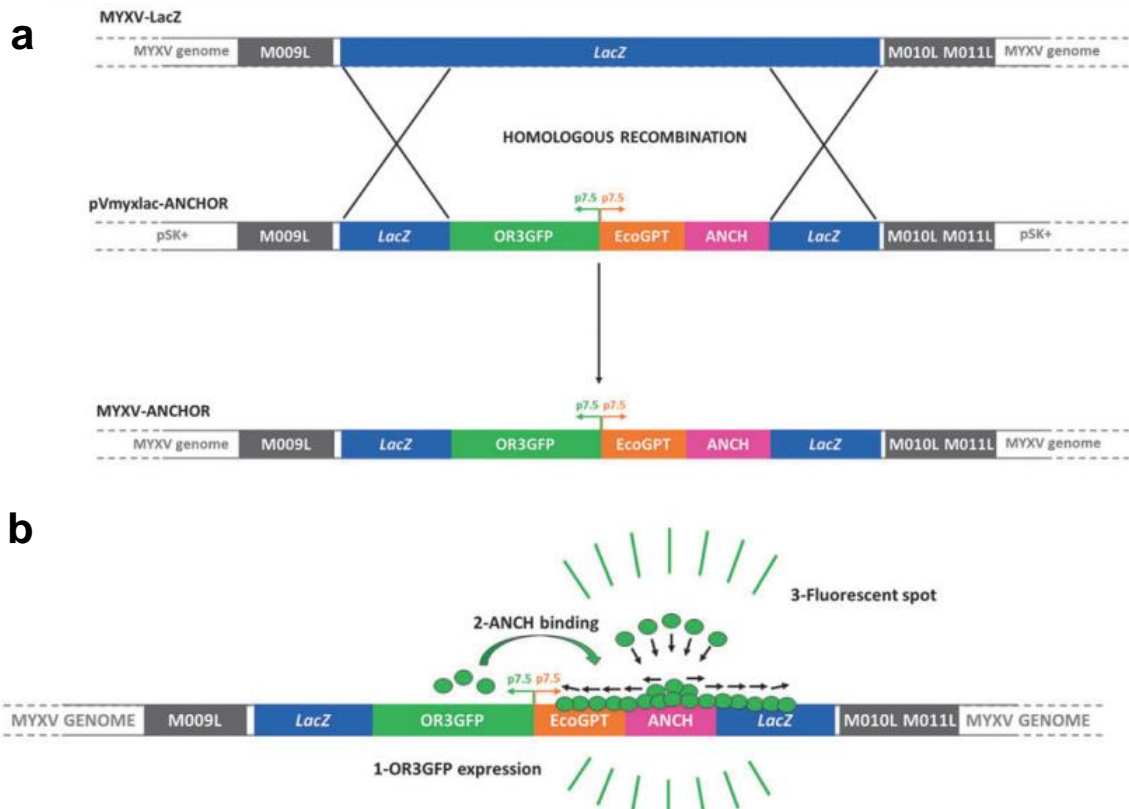


Figure 77 - Construction de MYXV-ANCHOR. a. Recombinaison homologue du gène LacZ du virus recombinant MYXV- LacZ et du plasmide donneur pVmyxlac-ANCHOR. b. L'accumulation du complexe de dimères ORGFP sur la séquence ANCH forme une tache fluorescente qui est détectée par microscopie à fluorescence (Quillien et al., 2021a).

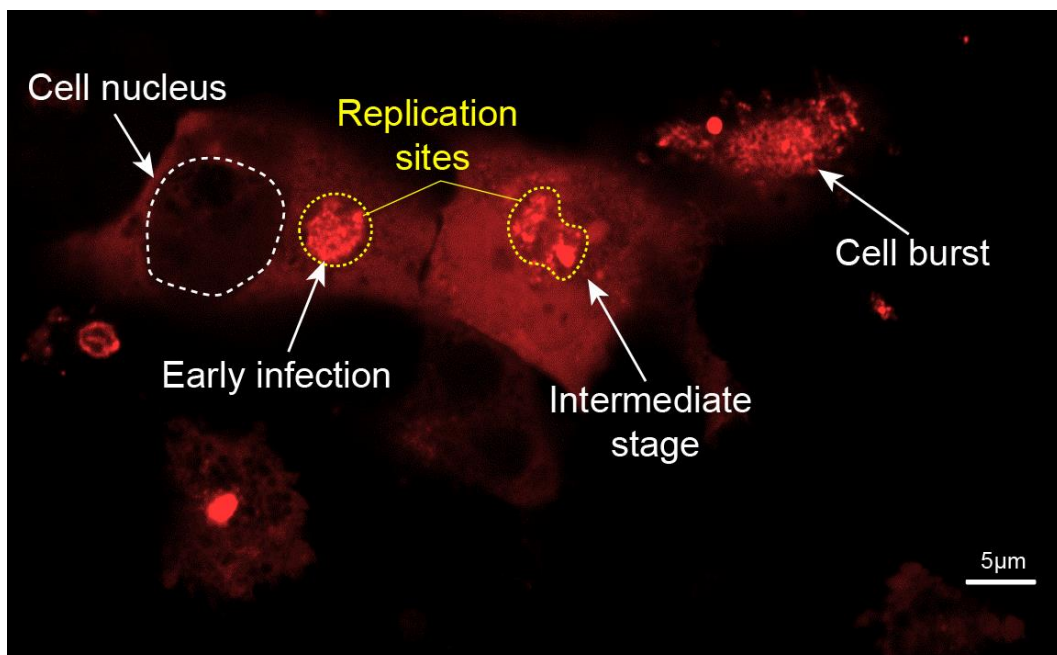


Figure 78 - Visualisation au confocal (63X) de 3cellules cultivées à 2D, à différents stades de l'infection : début d'infection (cellule de gauche), infection intermédiaire (cellule du milieu), fin d'infection (cellule de droite).

Les foyers fluorescents qui correspondent aux sites de réplication de l'ADN viral sont situés en zone périnucléaire. Selon le stade de l'infection, ils peuvent avoir différentes formes (voir Figure 78). Sur l'image, on peut voir une cellule (à gauche) en début d'infection : le foyer de réplication est bien défini autour du noyau. Nous pouvons également observer une cellule dans un stade intermédiaire, où le foyer de réplication est beaucoup plus diffus et composé de plusieurs sous-foyers. Si l'on regarde maintenant la cellule de droite, l'infection semble s'être étendue à l'ensemble de la cellule, et très probablement à un stade de lyse cellulaire.

Par la suite, nous allons tout d'abord présenter les résultats d'infection à 2D sur des plaques de différentes rigidité et sur l'effet sur l'encombrement, puis à 3D sur l'infection de sphéroïdes.

## 2. Etude à 2D

### a. Principe de l'expérience et analyse

La première étape consiste à ensemercer les cellules sur un substrat de culture de manière à obtenir une confluence d'environ 60%, comme indiqué dans les protocoles d'infection classique<sup>201</sup>. Une fois que les cellules ont bien adhéré sur le substrat (ce qui prend environ 48h pour nos cellules HeLa), le milieu de culture est remplacé par une solution virale qui est mélangée avec du milieu de culture neuf. Après avoir incubé les cellules pendant 1h à 37°C, le milieu de culture contenant le virus est aspiré puis remplacé par un nouveau milieu de culture (voir Figure 79). Enfin, l'acquisition au microscope est lancée quelques heures plus tard afin de pouvoir établir correctement la mise au point sur les premiers foyers de réplication virale.

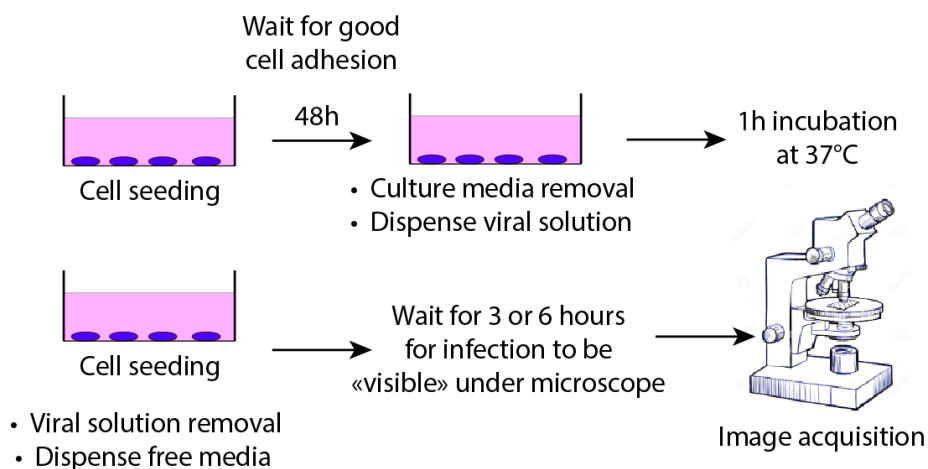


Figure 79 - Protocole d'infection des cellules cultivées à 2D.

Notons que la quantité de virus ajoutée au milieu de culture dépend selon la MOI (Multiplicity Of Infection) choisie. La MOI représente le nombre théorique de particules virales par rapport au nombre total de cellules. Par exemple, une MOI de 5 signifie qu'il y a en théorie au moins cinq virus par cellule qui ont déclenchés l'infection. Pour en savoir plus sur le détail des calculs liées à la MOI avant chaque expérience, vous pouvez consulter l'annexe 14 du manuscrit. Typiquement, pour les expériences, nous utilisons une MOI de 5. Nous imageons toutes les heures à la fois en lumière blanche et en fluorescence pendant plusieurs jours (voir Figure 80).

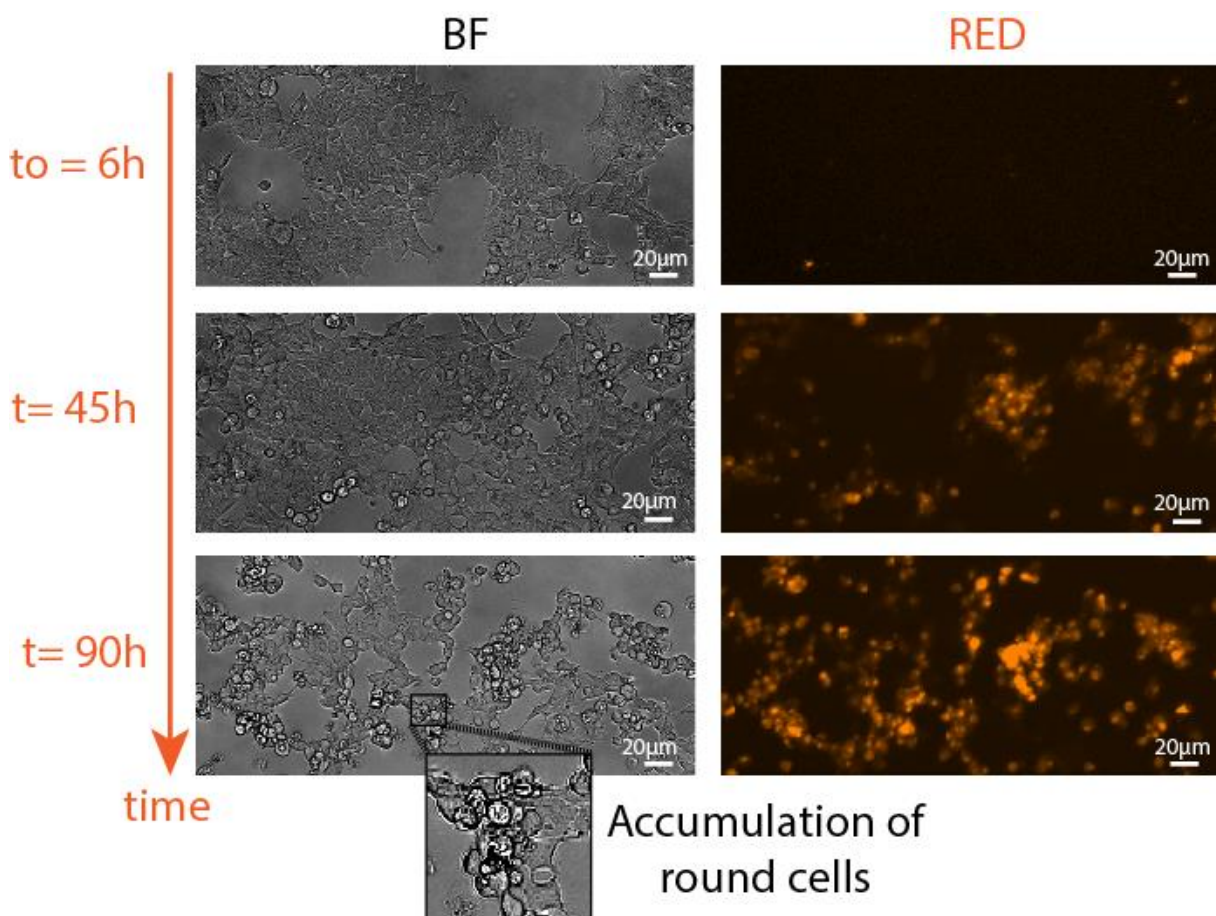


Figure 80 - Exemple d'images acquises lors des expériences d'infection. Dans cet exemple, les cellules sont cultivées sur un substrat en plastique. Les cellules ont été imagées à partir de la lumière blanche (images de gauche) et en fluorescence (images de droite).

Sur les images en lumière blanche, nous pouvons constater que la prolifération des cellules continue à 6h et à 45h, le nombre de cellules augmentant. En revanche, nous pouvons observer une baisse conséquente du nombre de cellules qui sont présentes à 90h (fin de l'expérience). Elles sont, pour la majeure partie d'entre elles, détachées du substrat ou en train de se détacher. Notamment, nous pouvons constater la présence d'un grand nombre de cellules ayant une forme arrondie, ce qui supposent qu'elles n'adhèrent plus au substrat de culture.

Les images en fluorescence révèlent la présence de quelques cellules déjà infectées 6h après le lancement de l'infection. Nous pouvons observer sur l'image en fluorescence prise à 45h que l'infection se répand par petit clusters, et que l'infection n'est pas homogène sur le substrat. En effet, il y a des zones où l'infection n'est pas encore visible au microscope.

Nous avons également remarqué que seules les cellules non infectées prolifèrent au cours de l'expérience. Enfin, nous pouvons voir que la quasi-totalité des cellules sont infectées à la fin de l'expérience (t=90h). Beaucoup de virus peuvent altérer le cycle cellulaire de la cellule qu'ils infectent<sup>202</sup>. C'est une stratégie commune, utilisée dans le but de créer un environnement favorable à la réplication virale. Celle-ci peut même entraîner l'arrêt du cycle cellulaire de la cellule hôte<sup>203</sup>. Dans le cas du virus de la myxomatose, une étude montre une stratégie différente : ce virus régule la transition de la phase G0 vers la phase G1 afin de ne pas entraîner l'arrêt du cycle cellulaire de la cellule hôte<sup>204</sup>. Cela permettrait de protéger les cellules infectées des différentes réponses antivirales innées qui sont normalement déclenchées par un arrêt du cycle cellulaire entre la phase G0 et la phase G1. En revanche, une accumulation des cellules infectées a été observée au niveau du point de contrôle entre la phase G2 et la phase M. Il serait donc intéressant d'observer comment le cycle cellulaire est régulé lors de l'infection des cellules par le virus SG33.

Pour analyser les expériences présentées dans la suite de ce chapitre, nous avons réalisé trois types de mesures :

- Calcul du ratio du nombre de cellules infectées rapportées au nombre total de cellules. Cette mesure nous donne une idée de la vitesse de propagation de l'infection.
- La mesure de l'intensité de fluorescence du foyer de réplication en cellule unique et au cours du temps. Cette mesure nous donne quant à elle une idée de la vitesse de réplication du virus au sein de la cellule.
- La mesure de l'intensité de fluorescence sur une zone comprenant l'ensemble des cellules imagées (analyse dite « en population »).

L'ensemble des expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées à partir de la lignée HeLa GEMs (nanoparticules de 40nm fluorescentes génétiquement encodées par les cellules pour effectuer des mesures de micro rhéologie). Nous avons commencé par analyser la dynamique d'infection du virus sur des cellules cultivées à 2D, sur des plaques de différentes rigidités.

## b. Impact de la rigidité du substrat sur la dynamique de l'infection

### *Analyses en population*

Les substrats utilisés sont des plaques à puits de la marque Cytosoft dans lesquelles une fine couche de PDMS d'une rigidité contrôlée a été déposée. Nous avons utilisé pour ces expériences deux substrats de rigidité différente : un substrat mou d'une rigidité de 0,5kPa et un substrat rigide en plastique dont la rigidité est de l'ordre du GPa. Notons qu'il est nécessaire de traiter les plaques avant l'expérience afin que les cellules adhèrent au substrat, selon un protocole indiqué par le fabricant des plaques de rigidité. Le protocole consiste à immerger les puits de culture à l'aide d'une solution contenant du collagène de type 1, puis d'incuber les plaques pendant 1 à 2h à température ambiante, et enfin de rincer les puits avec du PBS.

Les résultats des expériences montrant la propagation de l'infection du virus pour les deux substrats de rigidité différentes sont présentés sur la Figure 81 (a) et (b). Pour chacune des rigidités, le nombre de cellules infectées a été compté et normalisé par rapport au nombre total de cellules. Cette métrique nous permet de nous affranchir de la prolifération cellulaire, et de mesurer la propagation de l'infection.

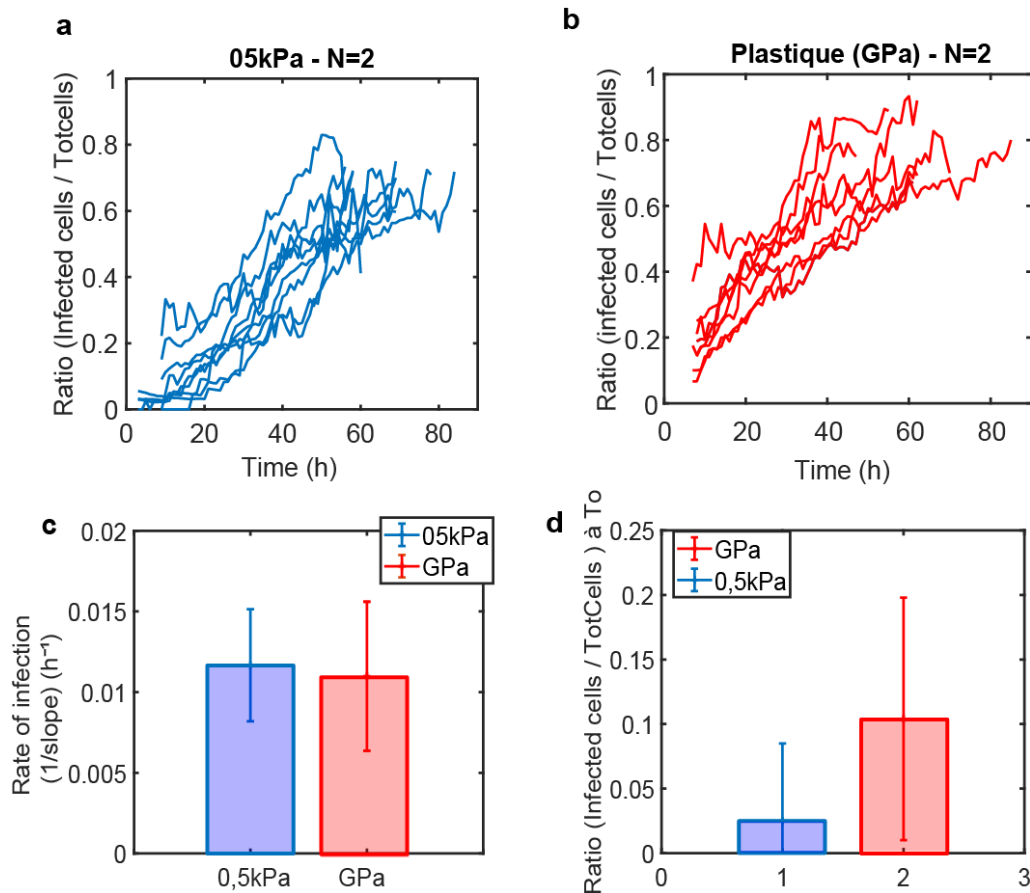


Figure 81 - Propagation de l'infection (Ratio des cellules infectées par rapport au nombre total de cellules) dans le cas : (a) d'un substrat mou (0,5kPa) et dans le cas (b) d'un substrat rigide (GPa, Plastique). (c) Comparaison des vitesses de propagation de l'infection entre les deux substrats. (d) Ratio de cellules infectées sur le nombre de cellule total au début de l'expérience (t=0h).

Lorsque les cellules sont cultivées sur un substrat de 0,5kPa (Figure 81a) ou sur un substrat comparable à une rigidité de l'ordre du GPa (plastique, Figure 81b), on observe deux régimes distincts, qui sont schématisés sur la Figure 82:

- Un premier régime à temps courts pendant lequel le taux d'infection augmente linéairement jusqu'à environ 50heures. A ce stade, plus de la moitié des cellules sont infectées dans les deux cas.
- Un second à temps plus longs pendant lequel le taux d'infection semble ralentir. A ce stade, il reste peu de cellules à infecter sur le substrat de culture (20 dernières heures).

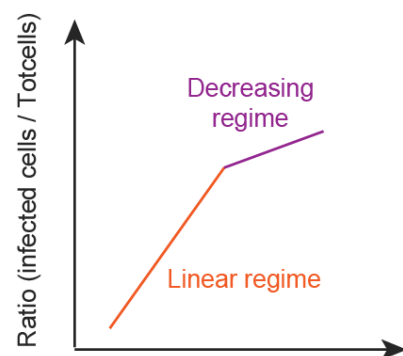


Figure 82 - Identification de deux régimes différents lors de la propagation de l'infection : un régime linéaire et un régime où la propagation de l'infection est ralentie.

A partir de ces données, nous avons ajusté des courbes affines pour chacune des courbes représentées sur les deux graphiques. Cela nous a permis d'obtenir la vitesse de propagation du virus à partir de la pente (voir Figure 81c). Il ne semble pas y avoir de différence significative entre les deux vitesses de propagation mesurées pour le substrat à 0,5kPa et le plastique car les valeurs mesurées pour les pentes sont très proches :  $0,011 \pm 0,003 \text{h}^{-1}$  et  $0,010 \pm 0,005 \text{h}^{-1}$  respectivement.

Comme nous pouvons le remarquer sur les graphiques (a) et (b), les courbes d'infection ne démarrent pas à  $T_0$  mais seulement 3 à 6 heures plus tard selon les conditions d'imagerie. Nous avons donc estimé pour chacune des courbes le ratio de cellules infectées juste après l'incubation des cellules avec le virus, à  $T_0$ , en extrapolant l'intensité de fluorescence à ce temps  $T_0$  (voir Figure 81d). Le ratio de cellules infectées à  $T_0$  par rapport au nombre total de cellules est d'environ 2,5% pour le substrat à 0,5kPa contre 10% pour le plastique. Bien que les barres d'erreurs soient grandes dans les deux cas nous pouvons émettre plusieurs hypothèses :

- Dans le cas du plastique, il peut y avoir plus de cellules infectées avec un seul virus, comparé au substrat mou. Les virus oncolytiques ont peut-être plus de facilité à entrer dans les cellules et/ou en sortir lorsqu'elles sont cultivées sur ce substrat.
- Il peut y avoir plus de cellules infectées (dans le cas du plastique) avec initialement plus de virus par cellule.
- Comme nous obtenons une vitesse de propagation virale similaire pour les deux substrats, cela suggère que s'il y a une différence du nombre de virus initial selon la rigidité, cette différence ne se reflète pas dans la vitesse de propagation. Pour en être sûr, il faudrait tester une autre MOI.

Par ailleurs, il est possible que l'infection virale dépende de l'organisation du cytosquelette de la cellule et plus particulièrement du cortex d'actine. D'un point de vue morphologique, nous pouvons voir sur l'annexe 15 que les cellules semblent être plus étalées sur le substrat en plastique que sur le substrat mou. Il faudrait compléter ces expériences avec des marquages en immunofluorescence qui révèlent l'expression du réseau d'actine pour les deux substrats.

Enfin, les images obtenues pour ces expériences nous ont permis de réaliser des analyses supplémentaires en cellule unique.

### Analyses en cellule unique

Nous avons également réalisé des analyses en cellule unique de l'intensité de fluorescence au niveau du foyer de réplication par rapport au temps, nous permettant de mesurer la vitesse de réplication du virion dans la cellule (voir Figure 84). Le début de l'analyse correspond à l'apparition du foyer de réplication dans la cellule. Nous considérons que la fin de l'analyse correspond au moment où la cellule infectée se détache du substrat (cellule ronde) et qu'elle n'est donc plus soumise à des contraintes de tension.

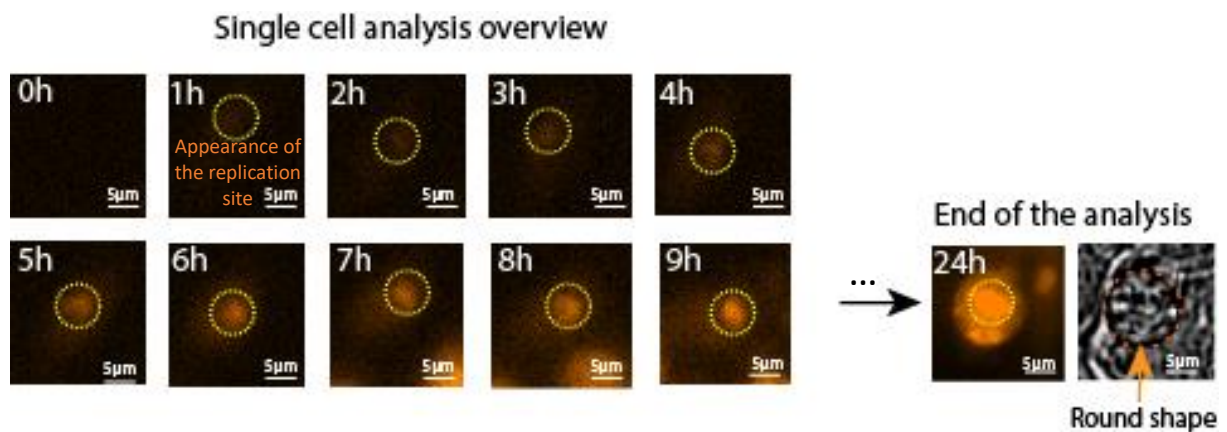


Figure 84 -Méthode d'analyse en cellule unique : mesure de l'intensité de fluorescence au niveau d'un foyer de réplication

Afin de ne pas avoir de biais au niveau du seuil de détection qui peut être variable d'un microscope à un autre, nous avons réalisé toutes les expériences avec un seul microscope, avec les mêmes paramètres d'imagerie. Notons que cette analyse est sujette à des erreurs de détection lorsque la confluence du substrat est trop importante (difficulté à suivre la cellule dans le temps). Chacune des courbes d'intensité correspondant aux mesures réalisées au niveau d'une cellule sont représentées sur la figure ci-contre :

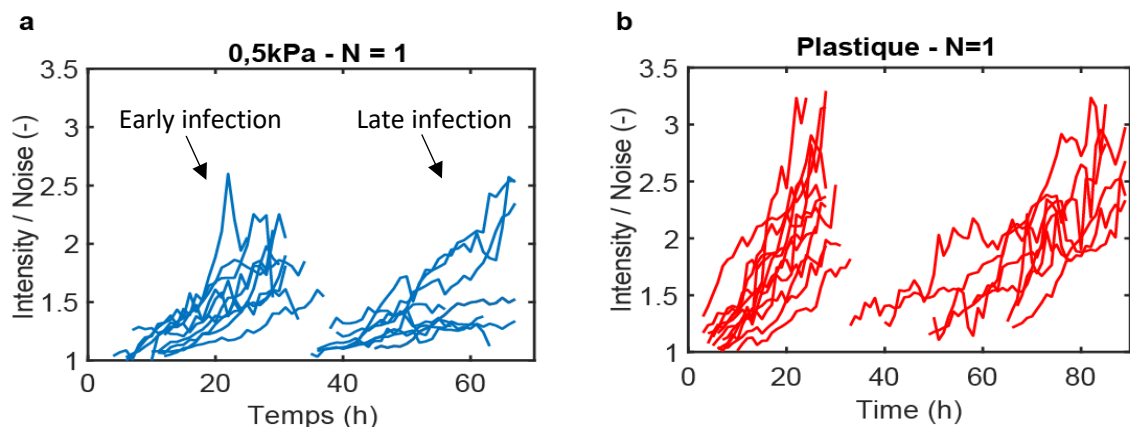


Figure 85 - Graphique représentant l'évolution de l'intensité au niveau du foyer de réplication dans plusieurs cellules, en début et en fin d'infection, dans le cas d'un substrat à 0,5kPa (a) et dans le cas du plastique (b).



Cette analyse nous permet de comparer les cellules infectées au début de l'expérience (après une dizaine d'heures) avec celles qui sont infectées plus tard, durant la propagation du virus, au milieu de l'expérience (48h).

Pour la majorité des courbes, on peut remarquer que dans une cellule, l'intensité de fluorescence des sites de réplication du virus augmente linéairement durant l'infection. Remarquons également que l'intensité de fluorescence (qui est normalisée par rapport au bruit de l'expérience) semble atteindre des valeurs plus grandes dans le cas du plastique. Nous pouvons supposer qu'il y a peut-être plus de virus par cellule dans le cas du plastique, ce qui serait à l'origine de cette intensité plus forte. Cette hypothèse rejoint celle que nous avons émise dans la partie précédente, en comparant les taux d'infection à  $T_0$ .

Nous allons séparer les analyses suivantes en deux parties : les analyses faites à partir des infections obtenues en début d'expérience (« early infections ») et celles faites à partir des infections tardives (« late infections »).

#### *Infections en début d'expérience*

Afin de pouvoir comparer au mieux les résultats obtenus pour ces deux substrats, nous avons extraits plusieurs paramètres qui sont représentées sur la Figure 86, à savoir :

- Le taux de production du virus : nous calculons ce taux à partir d'un ajustement affine de chacune des courbes précédentes. Ce taux correspond à la pente.
- $T_{ini}$  : le temps correspondant à l'apparition du foyer de fluorescence dans la cellule.
- $T_{end}$  : le temps où la cellule devient ronde (temps qui ne correspond donc pas à la fin de l'infection dans la cellule mais à une réponse biologique).

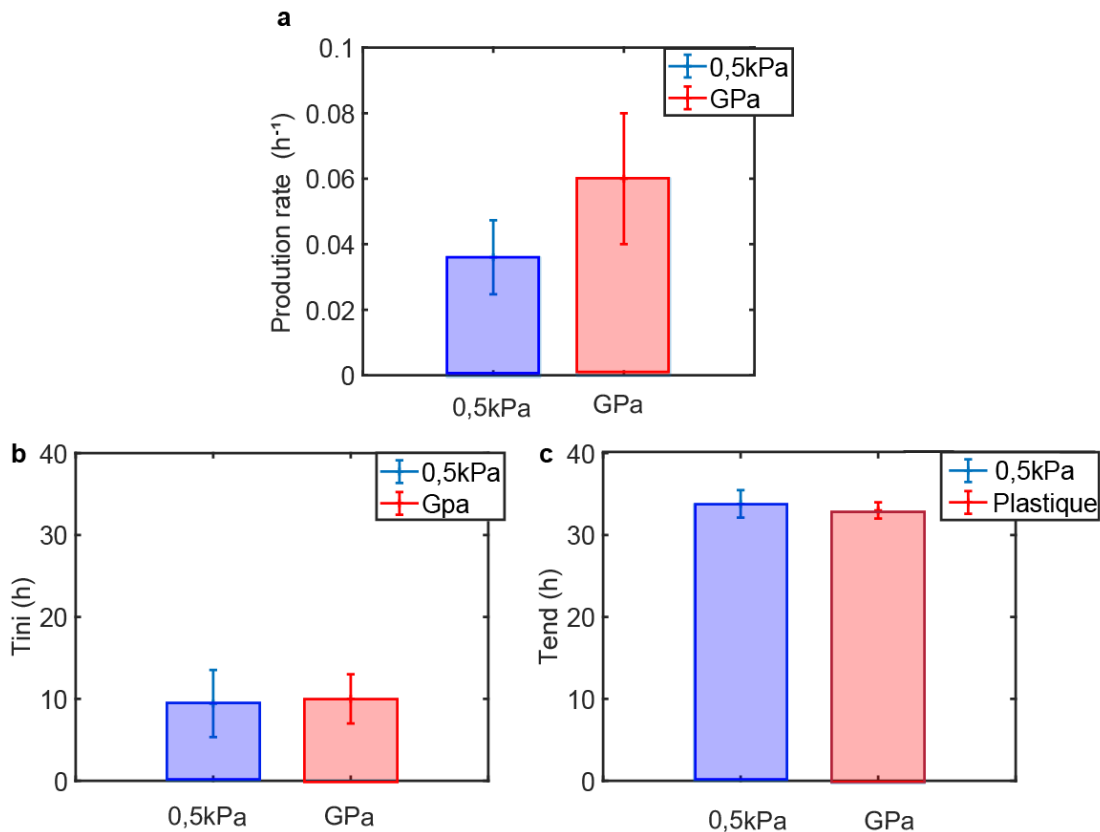


Figure 86 - (a) Temps de production. (b) Tini : temps correspondant à l'apparition du foyer de répliation. (c) Tend : temps correspondant au moment où la cellule devient ronde.

Le taux de production est quasiment deux fois plus rapide dans le cas du plastique comparé au substrat mou ( $0,06 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  contre  $0,03 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  respectivement). Si l'on met en lien ce résultat avec celui obtenu à partir des analyses en population, il semblerait de manière étonnante que ce temps de production n'influe pas sur la propagation de l'infection à l'échelle de la population puisque celle-ci est similaire dans le cas des deux substrats.

Le temps initial (Tini) mesuré en début d'infection est identique pour les deux substrats et vaut environ 10h. Nous remarquons que le temps (Tend) pour lequel la cellule devient ronde au cours de l'expérience est également très proche dans les deux cas :  $33,8 \pm 1,2 \text{ h}$  pour le substrat mou et  $33 \pm 1 \text{ h}$  pour le plastique. Cela suggère que la réponse biologique associée au détachement de la cellule du substrat semble indépendant de la rigidité. Notons que la cellule devient ronde 23 à 24 heures après l'apparition du foyer de répliation sur les images (durée correspondant à la différence entre Tend et Tini). Nous reviendrons sur ce phénomène biologique au cours la partie suivante.

### Taux de production pour les infections tardives

Le taux de production mesuré dans le cas des infections tardives est représenté, en comparaison avec les taux de production mesurés pour les cellules infectées en début d'expérience, sur la Figure 87:

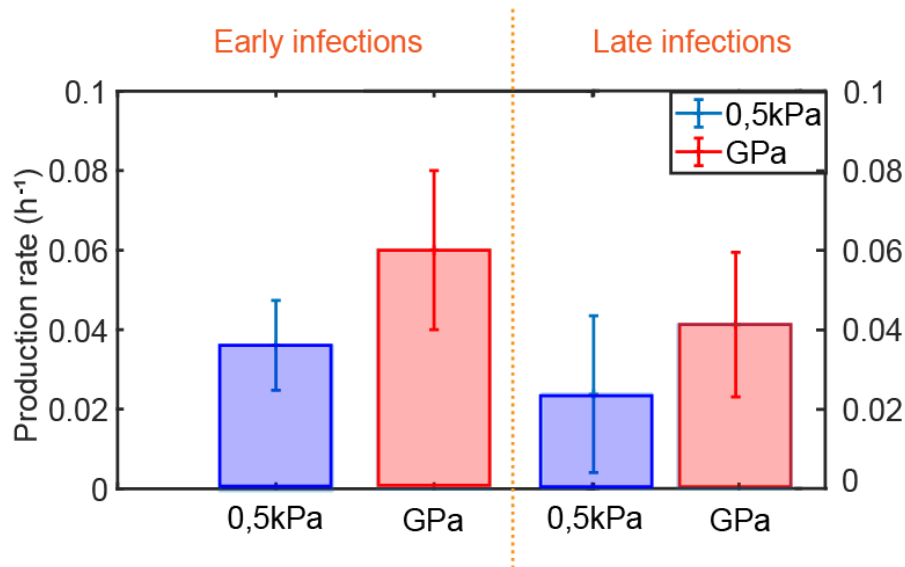


Figure 87 - Taux de production des cellules en début d'infection et temps de productions des cellules infectées tardivement pour le substrat à 0,5kPa et le plastique.

Le taux de production des cellules infectées tardivement est de  $0,023 \pm 0,019 \text{h}^{-1}$  dans le cas du substrat mou et de  $0,041 \pm 0,018 \text{h}^{-1}$  dans le cas du plastique. Le taux de production des cellules infectées tardivement est environ 2 fois plus élevé dans le cas du plastique que du substrat mou. Ce facteur entre les deux temps de production, est également visible pour les cellules infectées en début d'expérience.

Par ailleurs, notons la différence entre le taux de production mesurée pour les cellules infectées en début et en fin d'expérience d'infection : pour les deux substrats les temps d'infection sont plus faibles pour les cellules infectées tardivement. Cela suggère que le virus se réplique moins vite à des temps plus longs.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats suggère que, même si la vitesse de propagation du virus est similaire pour les cellules cultivées sur les deux substrats, la vitesse de répllication du virion (nouveau virus) est quant à elle différente et semble dépendre de la rigidité.

Le ratio de cellules infectées mesuré à  $T_0$  dans le cas des analyses en population ainsi que l'intensité de fluorescence du foyer de répllication en cellule unique, suggèrent qu'il y a plus de

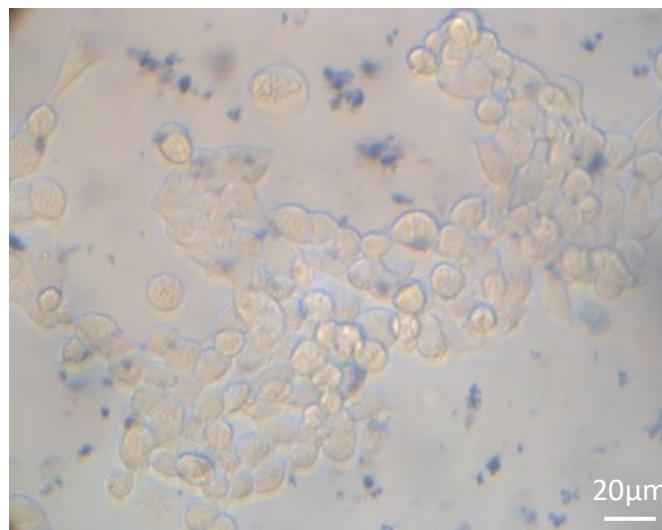
virus à l'intérieur des cellules infectées sur du plastique. Il est possible que le plus grand taux de réplication sur le plastique soit dû à un possible plus grand nombre de virus initialement présent dans les cellules, bien que cela ne semble pas en accord avec une vitesse de propagation virale similaire.

Par ailleurs, la réponse biologique correspondant à l'arrondissement de la cellule et au détachement de la cellule du substrat ne semble pas dépendre de la rigidité ni du nombre de virus présents dans la cellule, si l'on considère qu'il y a plus de virus dans les cellules infectées sur du plastique.

### c. Pourquoi les cellules sont-elles rondes en fin d'infection ?

Concernant les cellules qui se détachent du substrat et qui deviennent rondes, nous avons tout d'abord pensé qu'ils s'agissaient de cellules mortes suite à l'infection. L'un des moyens rapides de le vérifier est d'utiliser du bleu de Trypan, un colorant azoïque utilisé pour marquer les cellules ou tissus morts. Cette méthode d'exclusion repose sur la capacité du bleu Trypan à ne pénétrer que les cellules dont la membrane plasmique est endommagée. Les cellules saines n'étant pas perméables aux colorants de ce type, ce sont en théorie uniquement les cellules mortes qui sont colorées en bleu.

On peut voir sur la Figure 88 un exemple d'image en lumière blanche des cellules au moment de la fin de l'expérience, en présence de bleu Trypan :



**Figure 88 - Visualisation en lumière blanche des cellules infectées cultivées sur un substrat d'une rigidité de 16kPa. Utilisation du bleu de trypan pour marquer les cellules mortes.**

Les cellules rondes, que l'on peut distinguer vers le centre de la photo par exemple, ne sont pas de couleurs bleues, ce qui indique que leur membrane est encore intacte et que les cellules n'ont pas lysées. Notons que les nombreuses petites taches noires sur la photo correspondent aux débris présents initialement dans la solution virale, qui sont des débris d'origine cellulaire, issus de la lyse des cellules au moment de la phase d'amplification du virus.

Il est connu que certains virus peuvent causer des changements de morphologie cellulaire, phénomène connu sous le nom d'effets cytopathiques (ou cytopathogènes) sur les cellules<sup>205,206</sup>, qui peuvent se manifester par un arrondissement de la cellule. Ce phénomène a également été observé dans le cas du virus de la myxomatose<sup>207</sup>. Le virus de la vaccine, qui fait également partie de la famille des Poxviridae tout comme le virus de la myxomatose, cause par exemple d'importantes restructuration du cytosquelette<sup>208</sup>, comme le montre les images de la Figure 89 :

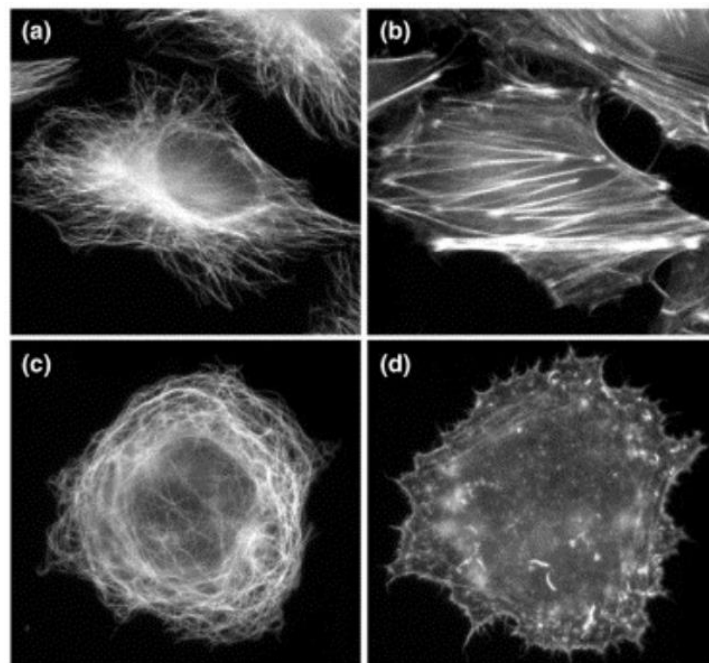


Figure 89 – Images d'immunofluorescence tirées de l'article Ploubidou *et al.* (Cell Biology, 2001). a,b : Cellule non-infectée. c,d : Cellule infectée. a,c : Marquage des microtubules. b,d : Marquage de l'actine.

La cellule représentée sur l'image (a) et (b) n'est pas infectée tandis que celle que l'on peut observer sur les images (c) et (d) est infectée par le virus de la vaccine. On peut voir sur les images (a) et (c) le marquage des microtubules dans le cas d'une cellule saine (a) et celui d'une cellule infectée par le virus de la vaccine (c). La cellule saine présente un réseau de microtubules « en étoile », les filaments s'étirent du centre de la cellule vers le bord. En revanche, ce réseau

semble être complètement déstructuré dans le cas d'une cellule infectée, et de fait, d'après les auteurs de l'article, le centrosome (centre organisateur des microtubules) n'est plus fonctionnel. Concernant le réseau d'actine, il est également très fortement impacté par l'infection. On peut voir que dans le cas d'une cellule saine, le réseau d'actine est très filamenteux et semble être relié d'une extrémité de la cellule à une autre. En revanche, dans le cas d'une cellule infectée, les filaments semblent détruits et l'expression de l'actine semble se concentrer sur le bord de la membrane cellulaire. Ainsi, il ne serait pas étonnant qu'un phénomène similaire soit observé dans le cas du virus SG33 que nous utilisons puisqu'il appartient à la même famille de virus. Des marquages d'éléments du cytosquelette seraient donc très intéressants à réaliser dans notre cas.

En conclusion, les contraintes de tension ne semblent pas impacter la vitesse de propagation du virus pour cette lignée cellulaire. En revanche, il y a des différences significatives au niveau des mesures faites en cellules uniques (sur le taux de production), ce qui semble suggérer que les contraintes mécaniques de tension influent sur la réplication des virions à l'intérieur de la cellule. Qu'en est-il des contraintes compressives ? Sont-elles un frein à l'efficacité d'infection du virus ? C'est ce que nous allons étudier dans la partie suivante.

#### d. Impact d'une compression unidirectionnelle sur l'efficacité d'infection du virus

Nous avons réalisé des expériences de compression unidirectionnelles sur des cellules cultivées à 2D. Le principe de l'expérience est de placer un coussin d'agarose au-dessus des cellules au moment de l'infection (voir Figure 90). C'est un coussin fabriqué à partir d'une solution d'agarose à 2%, et qui permet d'appliquer une pression de 200Pa sur les cellules par le poids qu'il applique. Dans cette expérience, la solution virale est ajoutée au milieu de culture pendant 1h, sans la présence de contraintes compressives. C'est seulement après le changement de milieu de culture, que le coussin d'agarose est placé au-dessus des cellules. Les résultats de la fluorescence totale sont présentés sur la Figure 91 :



Figure 90 - Compression à 2D sur une mono couche de cellules.

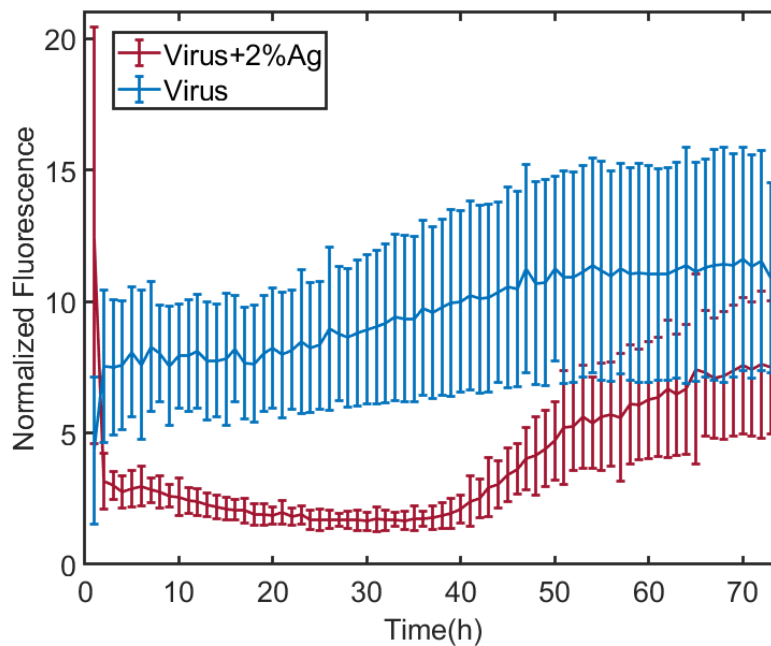


Figure 91 - Expérience d'infection sur des cellules cultivées à 2D avec et sans compression : évolution de l'intensité de fluorescence (en population) en fonction du temps.

En première analyse, la mesure de l'intensité de fluorescence a été faite sur l'ensemble des cellules, et non en cellule unique comme présenté précédemment. Deux conditions ont été testées : une infection virale faite sur des cellules cultivées à 2D : sans contraintes (courbe bleue) et avec contraintes compressives (courbe rouge).

On peut remarquer que la compression entraîne un important retard sur le début de l'infection (environ 40h). Cependant, juste après 40h, la dynamique de l'infection semble être plus rapide que celle obtenue sans compression.

Cette expérience et son analyse préliminaire soulèvent quelques questions. Dans un premier temps, il apparaît important de réaliser le même type d'analyse que précédemment pour l'impact de la rigidité, seulement nous n'avons pas pu le faire car les expériences ont été réalisées à partir d'un microscope d'incubateur, le CellCyteX, avec un objectif 4X qui n'est pas assez résolu pour faire des analyses en cellules uniques. Il faudrait faire cette expérience à nouveau, sur le même microscope que celui utilisé précédemment.

Biologiquement, il serait nécessaire de mieux caractériser le comportement des cellules à 2D sous compression sans infection, pour connaître les changements qui sont provoqués par la compression en tant que telle sur les cellules. Notamment, le cycle cellulaire est-il régulé différemment sous l'effet des contraintes compressives, comme nous l'avons vu dans le cas des

sphéroïdes, et si tel est le cas, ce retard sur l'infection virale est-il lié au cycle cellulaire ou à une adaptation de la cellule à la compression ?

Ensuite, il serait intéressant d'étudier si la compression mécanique provoque une réorganisation du cytosquelette et si cela a un impact sur l'entrée du virus dans la cellule, en supposant que celui-ci ne soit pas déjà entré dans la cellule avant la compression mécanique, lors de la durée d'incubation.

Par ailleurs, l'encombrement macromoléculaire est-il modifié lorsque les cellules sont cultivées à 2D sous contraintes mécaniques ? Celui-ci pourrait avoir un impact sur la vitesse de réplication des virions à l'intérieur des cellules, ce qui est une motivation supplémentaire pour entreprendre d'autres expériences permettant l'analyse en cellule unique.

#### e. L'infection provoque-t-elle un encombrement de la cellule ?

Les virus utilisent la machinerie cellulaire pour se répliquer. Une de nos hypothèses est basée sur le fait que la réplication virale augmente l'encombrement à l'intérieur de la cellule, et que cela pourrait être relié à la lyse cellulaire en fin d'infection. De plus, les résultats à différentes rigidités montrent que le taux de réplication est plus faible à 0.5 kPa que sur du plastique : à ces rigidités, l'encombrement basal est supposément différent, et cette différence pourrait peut-être impacter la réplication virale.

Dans le cas du virus SG33, il n'y a pas d'indication dans la littérature sur le nombre de virions (nouveaux virus) répliqués par cellule. On peut citer à titre d'exemple, que le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), qui est d'une autre famille de virus (rétrovirus), produit environ 50000 virions par cellule lors d'une infection<sup>209</sup>. C'est un virus d'une centaine de nanomètres de diamètre, comme le virus SG33 que nous utilisons. Si l'on prend le cas d'une infection virale produite dans une cellule hôte de 10µm de diamètre, cela représente environ 5% du volume total de la cellule qui serait occupé par ces virions. A noter ceci dit que le volume réellement occupé est celui du cytoplasme, qui peut être bien plus petit lorsque la cellule a un gros noyau.

Nous avons donc voulu étudier comment l'encombrement variait en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée au niveau du foyer de réplication, en réalisant une analyse en cellule unique du coefficient de diffusion. Les mesures ont été réalisées 48h après l'infection et sont présentées sur la Figure 92 :



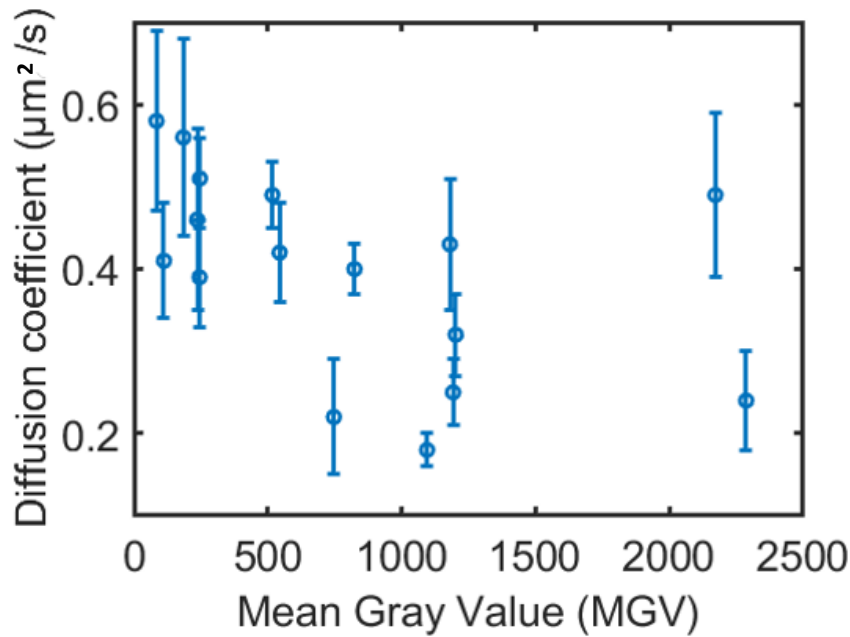


Figure 92 - Mesures du coefficient de diffusion dans les cellules infectées en fonction de l'intensité de fluorescence du foyer de réplication.

Chaque point expérimental sur le graphique représente la mesure de l'intensité de fluorescence du foyer de réplication de SG33 et du coefficient de diffusion des GEMs mesuré dans la même cellule. Les résultats obtenus sont très dispersés et sont donc difficiles à interpréter. Il semble qu'au début de l'infection (intensité inférieure à 600 en niveau de gris), la valeur de la diffusion oscille entre  $0,4$  et  $0,6\mu\text{m}^2/\text{s}$ , ce qui est très proche de la valeur de référence mesurée à 2D sans virus ( $0,55\mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Pour les valeurs de diffusion intermédiaires (entre 600 et 1300 en niveau de gris), les résultats sont compris entre  $0,2$  et  $0,4\mu\text{m}^2/\text{s}$ , ce qui suggère que l'encombrement macromoléculaire à ce stade est impacté par l'infection virale. Pour les plus hautes valeurs d'intensité de fluorescence, seulement deux valeurs très éloignées ont été mesurées (environ  $0,5\mu\text{m}^2/\text{s}$  et  $0,23\mu\text{m}^2/\text{s}$ ).

Il est difficile de conclure plus par rapport à ces résultats car on ne sait pas à quel stade de l'infection la cellule pour laquelle on mesure le coefficient de diffusion correspond, malgré les mesures faites au niveau de l'intensité de fluorescence. Dans le futur, il sera donc intéressant de réaliser le suivi d'une cellule dans le temps et de mesurer l'évolution du coefficient de diffusion durant l'infection, et de le corrélérer avec l'évolution de la fluorescence virale au cours du temps.

J'ai tenté de réaliser cette expérience « automatiquement » mais celle-ci n'a pas fonctionné. Nous avons créé une routine très simple sur Micro-Manager, qui est un logiciel utilisé pour paramétrer les paramètres d'acquisition du microscope. Pour mesurer la diffusion, il faut réaliser un court film de quelques centaines d'images toutes les 10ms ; afin de mesurer comment la diffusion varie, il faut boucler cette séquence toutes les 3h. J'ai eu quelques problèmes au départ pour optimiser le programme, qui présentait quelques bugs (mémoire vive saturée, contrôle du shutter bloqué, etc). Puis une fois qu'il était fonctionnel, il s'est révélé difficile d'avoir une cellule qui soit infectée et qui reste plusieurs heures dans le champ de l'objectif 63X, celle-ci pouvant se déplacer dans le temps. Pour cette expérience, il faudrait peut-être envisager de faire une acquisition manuelle pour pouvoir suivre les cellules infectées. En parallèle de ces expériences faites sur des cellules cultivées à 2D, nous avons voulu étudier l'infection du virus en 3D sur des sphéroïdes. Des résultats préliminaires ont pu être obtenus et sont présentés dans la partie suivante.

### 3. Infection sur des sphéroïdes

---

Pour cette expérience, les sphéroïdes sont cultivés dans des plaques à puit, sur un coussin d'agarose, sans compression. La solution virale est ajoutée au milieu de culture pendant 1h puis le milieu de culture est à nouveau renouvelé. Les images ont été réalisées à partir du microscope d'incubateur évoqué précédemment (CellCyteX), avec un objectif 4x (nous n'avons pas la résolution à ce grossissement pour mesurer en cellule unique). Sur la Figure 93, on peut observer des images faites à partir de deux sphéroïdes, à gauche : un sphéroïde contrôle et à droite : un sphéroïde infecté à 72h post-infection. Le sphéroïde contrôle a une forme bien définie, qui présente seulement quelques cellules rondes à sa surface. Le sphéroïde infecté est plus opaque et présente une accumulation de cellules rondes qui apparaissent en périphérie. Ce phénomène ressemble à l'effet cytopathique que l'on a observé sur des cellules cultivées à 2D : en fin d'infection, les cellules deviennent rondes et se détachent progressivement du sphéroïde.

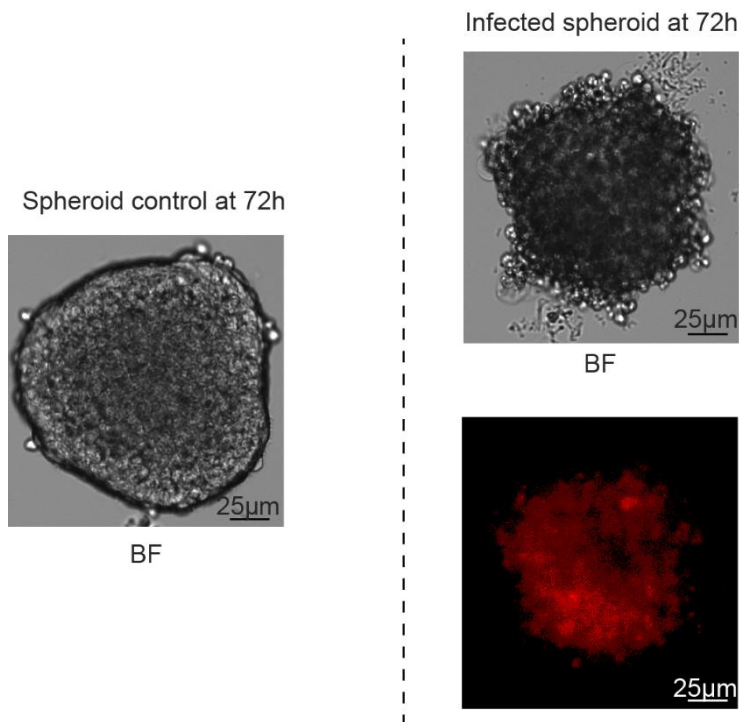


Figure 93 - Image de gauche : visualisation en lumière blanche d'un sphéroïde contrôle (non infecté par le virus). Images à droite : visualisation en lumière blanche et en fluorescence d'un sphéroïde infecté.

Nous avons mesuré le diamètre de chacun des sphéroïdes de la condition infectée et de la condition contrôle. Pour les sphéroïdes infectées, l'intensité de fluorescence a été reportée en gris, sur l'axe en ordonnée de droite (voir Figure 94).

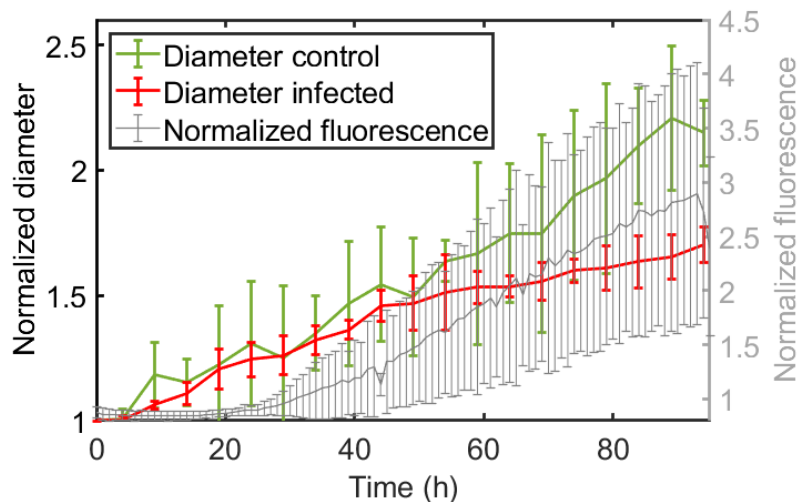


Figure 94 - Graphique présentant l'évolution du diamètre des sphéroïdes contrôles (courbe verte) avec celle des sphéroïdes infectés (courbe rouge). Sur le deuxième axe en ordonnée : représentation de l'intensité de fluorescence mesurée sur l'ensemble du sphéroïde par rapport au temps.

Au début de l'expérience, l'évolution du diamètre des sphéroïdes semble être similaire entre les deux conditions. Si l'on regarde la courbe grise correspondante à l'intensité de fluorescence, le début de l'infection semble commencer à partir de 24h, ce qui est différent de ce que nous

mesurons à 2D où l'infection démarre directement. En revanche, à partir de 48h, soit (en théorie) un cycle cellulaire plus tard, les sphéroïdes infectés ont un diamètre qui augmente nettement moins vite que les sphéroïdes contrôles. A la fin de l'expérience, les sphéroïdes infectés ont un diamètre environ 20% plus faible que les sphéroïdes contrôles, ce qui signifie que le virus a un impact sur la croissance du sphéroïde. Nous pouvons supposer que les cellules infectées ne prolifèrent plus, comme le suggèrent les observations faites sur les cellules infectées à 2D.

## 4. Conclusion et perspectives

---

### a. Conclusion

Nous avons réalisé des expériences qui nous ont permis de comparer la propagation de l'infection sur deux substrats de rigidité différente : un substrat mou (0,5kPa) et un substrat rigide (plastique, GPa). Nous n'avons pas observé de différences significatives au niveau de la vitesse de propagation de l'infection entre ces deux substrats. En revanche, les analyses réalisées en cellules unique montre que la rigidité a un potentiel impact sur la réplication des virions à l'intérieur de la cellule. En effet, le taux de production du virus est systématiquement plus rapide dans le cas du plastique (environ d'un facteur 2) que ce soit pour les cellules infectées au début de l'expérience que celles infectées tardivement. Par ailleurs, le taux de production est plus faible dans le cas des infections tardives comparé à celui des premières cellules infectées, et ce, quel que soit le substrat. Est-ce que cela suggère que l'infection virale est moins efficace aux temps longs ? Cela pourrait également expliquer le ralentissement de la propagation de l'infection observée lors de l'analyse en population, sur les vingt dernières heures de l'expérience.

De même, le ratio de cellules infectées initialement à  $T_0$  (qui est 4 fois plus important dans le cas du plastique) suggère que le virus infecte plus facilement les cellules cultivées sur du plastique : est-ce que le virus pénètre mieux dans les cellules cultivées sur du plastique ?

Par ailleurs, les cellules infectées deviennent systématiquement rondes, une vingtaine d'heures après l'apparition du foyer sur les images, quel que soit le substrat. Cela suggère que cette réponse biologique à l'infection virale est indépendante de la rigidité. Dans la littérature, des études montrent que les virus peuvent être à l'origine d'une déstructuration du cytosquelette de la cellule hôte (effets cytopathiques), qui entraînent notamment un arrondissement de la forme

de la cellule. Cet effet est probablement celui observé lors des expériences et pourrait être mis en évidence par la suite par des marquages de l'actine et des microtubules de la cellule. Ce changement morphologique (arrondissement des cellules) constitue-t-il une stratégie virale pour réaliser une infection plus efficace ?

Nous avons réalisé un deuxième type d'expérience pour étudier cette fois l'impact des contraintes compressives sur la dynamique de l'infection virale. Nous avons observé un retard important (40h) sur le début de l'infection lorsque les cellules sont cultivées à 2D sous compression. Il serait nécessaire de caractériser le comportement des cellules à 2D sous compression sans infection, pour connaître les changements qui sont provoqués par la compression en tant que telle sur les cellules. Des expériences sur l'étude de la régulation du cycle cellulaire à 2D sous contraintes permettraient d'en savoir plus sur l'origine du retard observé lors de l'infection : est-il lié au cycle cellulaire ? Ou alors est-il relié à un réarrangement du cytosquelette ? De même, comment est caractérisé l'encombrement des cellules qui sont sous contraintes au moment de l'infection ?

Les études réalisées par rapport à l'incidence de la réplication du virus sur l'encombrement de la cellule ne permettent pas encore de conclure. Des analyses faites en cellule unique du coefficient de diffusion et de l'intensité de fluorescence lors de la durée de l'infection seraient idéales pour approfondir cette étude.

Enfin, concernant les résultats obtenus pour des sphéroïdes en culture libre, ils suggèrent que l'infection provoque un ralentissement de la croissance du sphéroïde, visible 48h après le début de l'expérience, tandis que l'infection, elle, semble commencer à partir de 24h. Ce résultat nous amène à penser que l'infection virale des cellules dépend peut-être de la régulation du cycle cellulaire, comme des études le montrent déjà pour beaucoup de virus. Il serait intéressant de réaliser des expériences d'infection sur une lignée cellulaire transfectée avec le vecteur FUCCI, afin de pouvoir identifier les phases du cycle cellulaire de chacune des cellules infectées.

## b. Perspectives

Beaucoup d'expériences complémentaires permettraient d'approfondir cette étude sur l'impact des contraintes mécaniques sur l'efficacité d'infection du virus et sont mentionnées dans la conclusion (marquages des protéines du cytosquelette, mesure du coefficient de diffusion en cellule unique durant toute la durée de l'infection, infection sur des cellules FUCCI pour observer la régulation du cycle cellulaire, etc.).

D'autres substrats de rigidités différentes pourraient également être testés. Dans ce contexte, nous avons déjà réalisé plusieurs expériences sur un substrat d'une rigidité de 16kPa. Étonnamment, l'adhésion des cellules est inhomogène sur ce substrat, ce qui ne permet pas d'établir un protocole d'infection robuste, et ce qui a conduit à des résultats qui sont trop bruités pour être exploitées.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier la propagation du virus à l'intérieur des sphéroïdes. Les virus oncolytiques seraient-ils capables d'infecter les cellules jusqu'au centre du sphéroïde ? Nous pourrions notamment utiliser des billes fluorescentes de différentes tailles afin de mesurer la taille maximale qui peut pénétrer dans une assemblée tridimensionnelle. De plus, les résultats présentés au chapitre 3 suggèrent que les cellules du centre d'un sphéroïde sont soumises à des forces compressives contrairement aux cellules présentes sur les bords. Les cellules qui sont confinées par les voisines ont-elles moins de chance d'être infectées ?

Finalement, et en lien avec l'aspect thérapeutique qui nous intéresse, l'idéal serait de comparer les résultats avec des sphéroïdes spatialement confinés pour en savoir plus sur l'impact des contraintes compressives sur l'infection. Comme le virus ne peut diffuser à travers la matrice en agarose, ce type de méthode de compression par inclusion ne peut être utilisé. Notre puce microfluidique pourrait fonctionner, mais il nous faudrait montrer que le virus peut en effet passer facilement par les canaux d'alimentation du milieu de culture. Alternativement, nous pourrions réaliser des expériences de compression à partir du dextran<sup>42,210</sup>. Ce dernier permet de réaliser un choc osmotique à l'échelle du sphéroïde. Il a été montré que le dextran diminuait dramatiquement la prolifération cellulaire dans ces assemblées. Nous avons prévu ces expériences dans le cadre du stage de Zeina Chebbo, mais n'avons pu les réaliser. En parallèle, des mesures du coefficient de diffusion permettraient éventuellement d'établir un lien entre l'infection et l'encombrement de la cellule, en comparant les résultats obtenus sur des sphéroïdes libres et confinés.

## Conclusion et perspective générale

---

D'un point de vue physiologique, la mécanique est inhérente au bon fonctionnement de nos organes. Elle se manifeste sous la forme de contraintes de tension, de cisaillement et de compression, que l'on peut observer à l'échelle macroscopique mais qui se transmettent depuis les tissus biologiques jusqu'au cellules, où elles peuvent engendrer des contraintes, des déformations ou des réponses cellulaires spécifiques. Les cellules peuvent à la fois ressentir les forces (au travers de la mécanotransduction) mais également en générer, lors de la migration ou de la prolifération cellulaire par exemple.

Par ailleurs, d'un point de vue pathologique et plus particulièrement dans le cas du cancer, les forces mécaniques de tension, de cisaillement et de compression sont étroitement liées à la progression tumorale. Elles peuvent entraîner l'activation de voies de signalisation régulant la motilité cellulaire, la prolifération, la migration, la survie des cellules, etc. Les contraintes mécaniques peuvent entraîner des réponses cellulaires spécifiques. Par exemple, les contraintes de cisaillement peuvent impacter directement la survie des cellules cancéreuses qui s'échappent du site tumoral de la tumeur primaire et ainsi avoir une influence dans l'apparition des métastases. Les contraintes mécaniques de tension, quant à elles, peuvent par exemple modifier la rigidité des tissus et provoquer l'invasion des cellules cancéreuses dans les tissus environnants. Enfin, la prolifération des cellules dans un environnement spatialement limité peut entraîner l'apparition de contraintes compressives et l'émergence d'une pression induite par la croissance des cellules. Les contraintes compressives sont à l'origine d'une diminution de la prolifération cellulaire et, de fait, induisent une résistance thérapeutique aux médicaments utilisés classiquement en chimiothérapies (comme la gemcitabine) qui ciblent les cellules prolifératrices. Il est donc nécessaire de développer des outils qui soient adaptés à l'étude de ces contraintes. La majorité des dispositifs actuels utilisés dans ce sens sont des systèmes à base d'hydrogels qui présentent des limitations. Bien qu'ils permettent de faire des études statistiques et d'avoir un bon contrôle sur l'environnement chimique des objets biologiques, le contrôle de l'environnement chimique ainsi que de l'environnement mécanique est réalisé dans des conditions statiques. De plus, la majorité des dispositifs nécessitent la mise en place d'un traitement chimique afin de récupérer l'échantillon à la fin de l'expérience. Par ailleurs, les puces microfluidiques actuelles qui permettent d'étudier les contraintes compressives, ne permettent pas de confiner totalement le sphéroïde, ce qui limite l'accumulation de la pression induite par la croissance des cellules.

Dans ce contexte nous avons développé un dispositif microfluidique permettant de confiner spatialement plusieurs sphéroïdes en parallèle, au moyen d'un élément innovant, appelé tigarette, qui permet d'ouvrir et de refermer les chambres de culture. De plus, l'intégration d'un capteur de pression sous la forme d'une membrane déformable permet de mesurer des pressions de croissance allant jusqu'à 3kPa. Enfin, grâce aux tigarettes, la récupération de l'échantillon est possible après l'expérience.

Grâce à ce dispositif, nous avons pu observer une accumulation de cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire sous l'effet de la pression induite par la croissance, ce résultat étant en accord avec ceux déjà présentés dans la littérature. Par ailleurs, nous avons étudié l'impact de la pression induite par la croissance des cellules sur un paramètre biophysique : l'encombrement macromoléculaire. Ce dernier a une influence sur la diffusion des macromolécules à l'intérieur du cytoplasme. Ainsi, l'encombrement macromoléculaire peut moduler la conformation des protéines ainsi que la réactivité de certaines réactions biochimiques à l'intérieur de la cellule. Cette étude nous a permis de montrer que, tout comme les levures, la pression induite par la croissance des cellules augmente l'encombrement macromoléculaire à l'intérieur du cytoplasme de la cellule.

Enfin, les performances de ce dispositif microfluidique peuvent être améliorées en utilisant deux nouvelles méthodes de microfabrication récemment testées. La première consiste à fabriquer les moules microfluidiques grâce au Nanoscribe, une machine permettant de faire du prototypage rapide à travers la construction de moules microfluidiques présentant une meilleure résolution. Ainsi, d'autres configurations du capteur de pression peuvent être envisagées afin d'augmenter la sensibilité et la gamme de mesure de la pression induite par la croissance. Par ailleurs, la nouvelle machine (Femtika) récemment achetée, permet de réaliser de la gravure sur verre. Grâce à cette technologie et sa résolution micrométrique, la construction de nouvelles tigarettes présentant différentes fonctionnalités peut être envisagée. Par exemple, la structuration d'électrodes sur les parois des tigarettes permettrait de réaliser des mesures métaboliques (pH, oxygène) en étant immergées dans le milieu de culture des sphéroïdes confinés.

En parallèle de ces expériences, nous avons mené une étude sur la structuration mécanique des sphéroïdes. Grâce à des simulations, nous avons modélisé la croissance d'une cellule en fonction de sa position au sein d'un sphéroïde. Les résultats suggèrent que la pression de croissance développée par une cellule doublant de volume avant la division cellulaire, est plus faible au bord du sphéroïde qu'au centre, dans le cas d'un sphéroïde libre. En particulier, les simulations révèlent la présence d'un gradient de pression allant d'environ 400Pa à 800Pa à



l'intérieur même d'un sphéroïde libre. Par ailleurs, la variation du module élastique du sphéroïde montre que le gradient de pression est de plus en plus faible à mesure que l'élasticité du sphéroïde diminue. Les simulations nous ont permis également de montrer que le gradient de pression est similaire dans le cas d'un sphéroïde de 100 et 200 $\mu\text{m}$  de diamètre. Par ailleurs, ces résultats combinés aux expériences de marquage par immunofluorescence, montrent que la probabilité d'avoir une cellule en division est plus forte sur le bord du sphéroïde, là où la pression est la plus faible et que cette probabilité décroît à mesure que l'on se rapproche du centre du sphéroïde. De plus, les mesures du coefficient de diffusion à l'intérieur du cytoplasme dans le cas d'un sphéroïde libre révèlent une diminution de l'encombrement macromoléculaire du bord du sphéroïde vers le centre. En revanche, les résultats des simulations semblent présenter une incohérence quant à la valeur de la pression de croissance correspondante à une valeur de diffusion faible ( $0,3\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) : les expériences montrent que ce coefficient de diffusion est atteint pour des valeurs de pression proches de 2kPa tandis que les résultats des simulations indiquent une pression de croissance proche de 800Pa. Une telle différence peut s'expliquer par une simulation trop simpliste : l'absence de surface de tension pourrait influencer les résultats ou la pression de croissance modélisée à partir d'une seule cellule est très inférieure à celle que l'on pourrait mesurer d'une cellule en contact avec d'autres cellules en croissance. Nous avons une simulation en rapport avec ce dernier point, qui montre effectivement que la pression de croissance d'une cellule augmente considérablement lorsque celle-ci est proche d'une cellule voisine (passage de 800Pa à environ 1400Pa en pression). Enfin, la modélisation d'un sphéroïde confiné montre que le gradient de pression est inversé dans ce cas par rapport au sphéroïde libre. En effet, il devient beaucoup plus dur pour les cellules de se développer au bord du sphéroïde, là où l'élasticité est comparable à une rigidité infinie (impossibilité de déformer). La valeur de la pression de croissance au bord atteint environ 1245Pa, tandis qu'au centre elle est comparable à la pression de croissance obtenue dans le cas d'un sphéroïde libre (850Pa).

Les perspectives liées à cette étude seraient d'augmenter la complexité du modèle en ajoutant par exemple un paramètre au niveau de la tension de surface du sphéroïde et en modélisant plusieurs cellules dans le sphéroïde. Par ailleurs, d'autres mesures du coefficient de diffusion faites dans le cas d'un sphéroïde confiné permettraient d'augmenter les statistiques et de confirmer les résultats actuels. Enfin, il serait intéressant de retrouver expérimentalement la forme du gradient de pression à partir d'expérience d'incision réalisées sur des sphéroïdes. Des simulations d'éléments finies permettent également de remonter au champ de contraintes à partir du champ de déformation.

Enfinement, nous avons mené une étude sur une thérapie prometteuse dans le traitement du cancer : les virus oncolytiques. En s'attaquant préférentiellement aux cellules cancéreuses et en activant la réponse du système immunitaire contre la tumeur, ils sont de bons candidats pour traiter le cancer. Cependant, l'influence des contraintes mécaniques sur l'infection virale n'a pas été traitée à ce jour. Les contraintes mécaniques liées à la rigidité, qui sont fortes dans le cas du cancer, induisent une restructuration du cytosquelette d'actine qui pourraient par exemple aider les virions à s'échapper de la cellule hôte. Dans ce contexte, nous avons mené des études d'infection à 2D sur des cellules cultivées sur deux substrats de rigidité différente : un substrat mou de 0,5kPa et un substrat dur (plastique) dont la rigidité est de l'ordre du GPa. Les résultats obtenus à partir d'analyse en population suggèrent que la vitesse de propagation de l'infection est indépendante de la rigidité, malgré une proportion de cellules infectées plus importante à  $T_0$  dans le cas du plastique. En revanche, les analyses faites en cellules uniques montrent que le taux de production est 2 fois plus rapide dans le cas du plastique que dans le cas du substrat mou. Aussi, l'observation d'un effet cytopathique sur les cellules (arrondissement de la cellule et détachement de la cellule du substrat) apparaissent environ 20h après l'apparition du foyer de réplication sur les images, quel que soit le substrat, suggérant que ce phénomène biologique est indépendant de la rigidité. Par ailleurs, des études préliminaires sur l'effet de la compression de cellules à 2D sur l'infection révèlent qu'il y a un retard important par rapport au déclenchement de l'infection (environ 40h). Il serait nécessaire de caractériser le comportement des cellules à 2D sous compression sans infection, pour connaître les changements qui sont provoqués par la compression en tant que telle sur les cellules. Des expériences sur l'étude de la régulation du cycle cellulaire à 2D sous contraintes permettraient d'en savoir plus sur l'origine du retard observé lors de l'infection, notamment pour savoir s'il est lié au cycle cellulaire ou alors à un réarrangement du cytosquelette.

Les études réalisées par rapport à l'incidence de la réplication du virus sur l'encombrement de la cellule ne permettent pas encore de conclure. Des analyses faites en cellule unique du coefficient de diffusion et de l'intensité de fluorescence lors de la durée de l'infection seraient idéales pour approfondir cette étude.

Enfin, concernant les résultats obtenus pour des sphéroïdes en culture libre, ils suggèrent que l'infection provoque un ralentissement de la croissance du sphéroïde, visible 48h après le début de l'expérience, tandis que l'infection, elle, semble commencer à partir de 24h. Ce résultat nous amène à penser que l'infection virale des cellules dépend peut-être de la régulation du cycle cellulaire, comme des études le montrent déjà pour beaucoup de virus. Il serait intéressant de

réaliser des expériences d'infection sur une lignée cellulaire transfectée avec le vecteur FUCCI, afin de pouvoir identifier les phases du cycle cellulaire de chacune des cellules infectées.

## Annexe 1 : Expériences de fuite

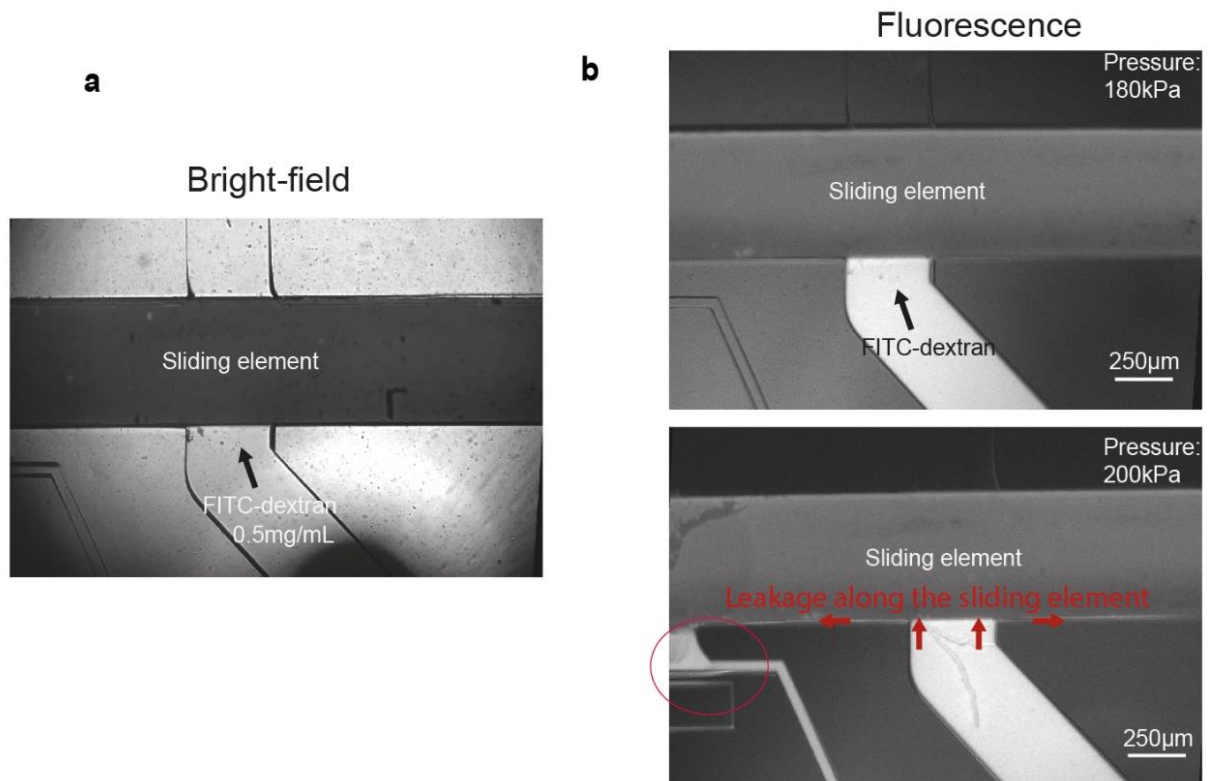


Figure 95 – a. Vue en lumière blanche de la tige qui fait face à l'entrée pressurisée avec une solution fluorescente (dextran). b. Image du haut : vue en fluorescence de l'entrée de liquide pressurisée à 180kPa. Image du bas : vue de la fuite de liquide pour une pression de 200kPa : la fuite se fait le long de la tige et atteint le canal voisin.

## Annexe 2 : Autofluorescence tigette en verre versus tigette en film sec

---

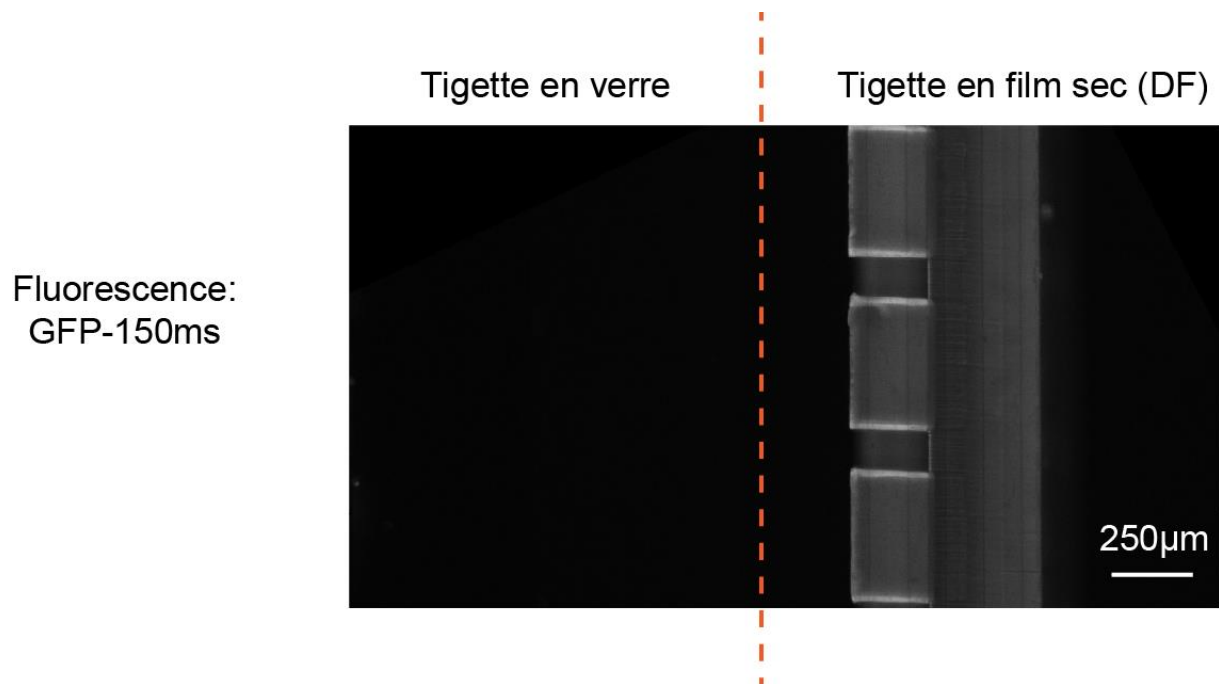


Figure 96 - Comparaison de l'autofluorescence pour une tigette en verre (à gauche) et une tigette en film sec à droite.

## Annexe 3 : Code Matlab du programme utilisé pour analyser la déformation des membranes

```
function [time,disp] = analyze_membrane(dt);

dt = 60/60;

[name,path] = uigetfile('.tif','multiselect','on');
cd(path)
name = cell2mat(name');
num_image = size(name,1);
time = 0:dt:dt*(num_image-1);
disp = zeros(1,length(time));
filter = fspecial('motion',10,0);

for j = 1:num_image

    I0 = imread(name(j,:));
    I0=imcomplement(I0);
    If = imfilter(I0,filter);
    BW = edge(If , 'Prewitt');
    y = zeros(1,size(I0,2));

    for i=1:size(I0,2)

        if isempty(find(BW(:,i) == 1) ) == 0
            y(i) = max(find(BW(:,i) == 1));
        end
    end

    disp(j) = median(y(y>0))/9.6923;

end
disp(1)=0;
figure
plot(time,disp)
xlabel('time')
ylabel('disp')
xlswrite('data.xlsx',[time(:),disp(:)]);
P=disp/8.05
figure
plot (time,P)
xlabel('time')
ylabel('P(kPa)')

end
```

Figure 97 - Code Matlab développé pour mesurer la déformation du capteur de pression.

## Annexe 4 : Précisions des paramètres pour la fabrication de la couche SU8 à 2 $\mu$ m d'épaisseur.

---

- Tournette

Mélange de résine SU8 1 :1 (6000.5 et 6005)

Vitesse de rotation : 2500 rpm

Accélération : 3000 rpm/s

Temps de rotation : 30s

Puis recuit à 100°C pendant 2min.

- Insolation avec la MA6 Gen-4 :

Dose : 300mJ/cm<sup>2</sup>

Recuit après exposition : 100°C pendant 2min

## Annexe 5 : Formation des sphéroïdes avec la méthode de la goutte pendante

Il existe plusieurs méthodes permettant de fabriquer des sphéroïdes. Au LAAS-CNRS, les scientifiques utilisent des puits dans lesquelles ils polymérisent un « coussin » d'agarose, puis ils ajoutent la solution de cellules ainsi que son milieu (voir Figure 98.A). Les extrémités du coussin étant relevées à cause de phénomènes de capillarité, les cellules vont sédimenter au centre du puit et former des liaisons entre-elles, amenant à l'émergence d'une tension de surface, rendant l'agrégat, au bout de quelques jours, sphérique.

Une autre méthode, dite de la « goutte pendante » est décrite dans la littérature<sup>211</sup> et a été mise en œuvre au cours de mon stage. Par rapport aux sphéroïdes formées dans les plaques à puit, elle est plus rapide à réaliser et permet de prélever facilement les sphéroïdes. Elle consiste à déposer des gouttes d'une dizaine de microlitres sur le couvercle d'une boîte de Petri et d'introduire un solvant dans l'autre partie afin de limiter l'évaporation des gouttes (voir Figure 98.B). Le principe repose sur la sédimentation des cellules dans le fond de la goutte qui vont faire des liaisons et se diviser pour former une unité cohésive.

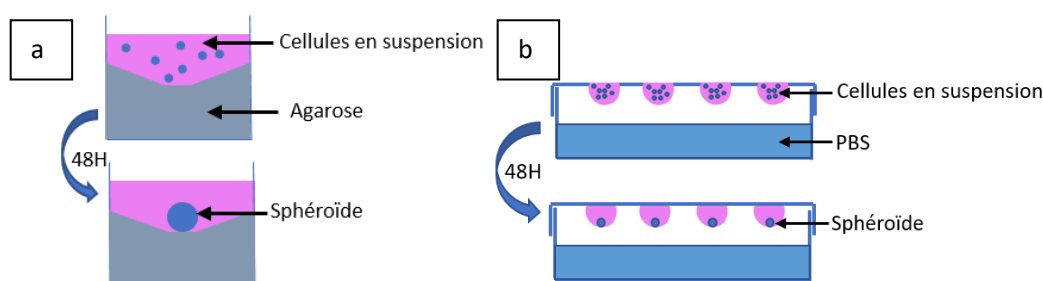


Figure 98 - A : Formation d'un sphéroïde dans un puit. B : Formation des sphéroïdes dans des gouttes.

D'une façon générale, les cellules sont cultivées au laboratoire dans une flasque. Elles adhèrent sur l'une des parois et se divisent jusqu'à occuper la majorité de l'espace disponible (voir Figure 99). Pour assurer leur continuité et leur caractère prolifératif, il est nécessaire de les diluer dans une nouvelle flasque tous les 2-3 jours.

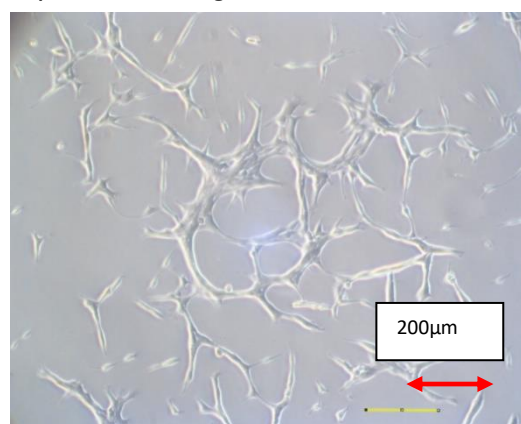


Figure 99 - Cellules tumorales du Pancréas cultivées sur le fond d'une flasque sur laquelle elles adhèrent.



Afin d'adapter la taille des sphéroïdes à notre système, plusieurs tests ont été effectués à diverses concentrations initiale de cellules. Dans un premier temps, la concentration en cellules présente dans la flasque mère est déterminée. Pour cela, un volume d'une dizaine de microlitres est prélevé puis injecté dans une grille de comptage. Au moins une centaine de cellules doivent être comptées dans un ou plusieurs carrés de la grille. Le calcul suivant est ensuite effectué pour déterminer la concentration en cellules dans la flasque mère :

$$\text{Concentration en cellules} \left( \frac{\text{cellules}}{\text{mL}} \right) = C_m = \frac{\text{Nb de cellules comptées}}{\text{Nb de carrés}} * 10000$$

La concentration de la goutte, notée  $C_f$  est calculée à partir du nombre de cellules souhaitée dans une goutte de  $10\mu\text{L}$ . Le volume de la solution utilisée pour prélever les gouttes ( $V_f$ ) doit être suffisamment élevé pour limiter les incertitudes de mesures liées au pipetage. Un calcul de dilution est ensuite effectué pour déterminer le volume de la solution mère ( $V_m$ ) à prélever :

$$C_m V_m = C_f V_f$$

$$V_m(\text{mL}) = \frac{C_f V_f}{C_M}$$

Dans un premier temps, plusieurs concentrations différentes ont été testés dans les gouttes, allant de  $N=500$  cellules par sphéroïde à  $N=1000$  cellules par sphéroïde. Le graphique ci-dessous (Figure 100) correspond à la mesure du diamètre du sphéroïde en fonction du nombre de cellules théorique dans la goutte :

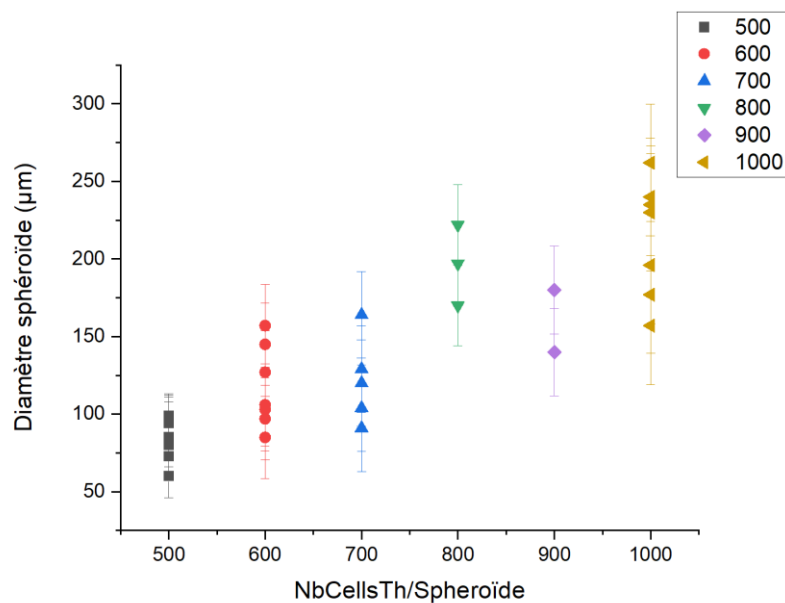
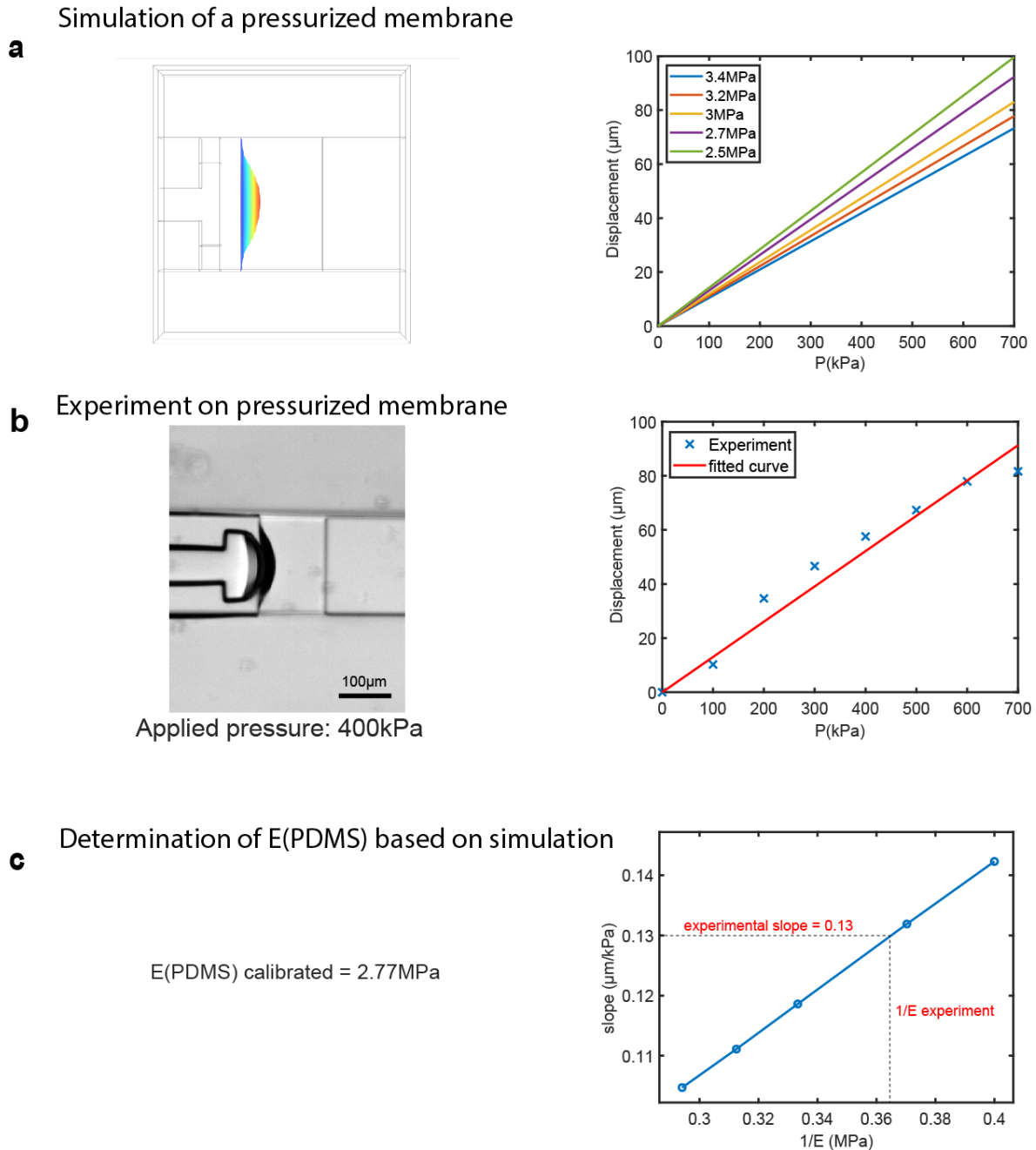


Figure 100 - Diamètre du sphéroïde en fonction du nombre de cellules théorique dans la goutte

Pour chaque concentration, une trentaine de gouttes ont été déposés sur le couvercle de la boîte Pétri. Les agrégats non circulaires n'ont pas été pris en compte pour ces mesures, ce qui explique qu'il y ait moins de points pour certaines concentrations.

Le diamètre des sphéroïdes augmente linéairement lorsque le nombre de cellules présentes dans la goutte augmente. L'incertitude de mesure représentée par les barres d'erreurs sur le graphique caractérise à la fois le bruit technique et biologique présents lors de l'expérience. Le bruit technique provient principalement des erreurs de mesures liées au pipetage et le bruit biologique dépend des conditions dans lesquelles les échantillons ont été manipulés. Par exemple, les cellules sont sensibles à la température et peuvent se comporter différemment en fonction de la durée pour laquelle elles sont placées en dehors de l'incubateur, à une température défavorable. Ce bruit biologique peut également provenir d'agrégats qui étaient déjà formés avant la déposition des gouttes ou encore de la sédimentation des cellules au fond du tube dans lequel sont prélevées les gouttes. Lors de l'expérience, il est donc primordial d'homogénéiser au maximum la solution afin de casser les agrégats et de répartir les cellules dans l'ensemble de la solution.

## Annexe 6 : Détermination du module de Young expérimental du PDMS



**Figure 101 - Calibration des propriétés mécaniques du PDMS pour utiliser le capteur de pression. a. Simulation et déplacement d'une membrane fixée sur ses quatre arrêtes en fonction de la pression pour différents modules d'Young du matériau. b. Expérience avec une membrane attachée sur ses 4 arrêtes et sa déformation en fonction de la pression imposée. c. La pente de la déformation de la membrane simulée est inversement proportionnelle au module de Young.**

## Annexe 7 : Comparaison des courbes de pression obtenus à l'aide de deux méthodes expérimentales : croissance confinée d'un sphéroïde dans un hydrogel et croissance confinée d'un sphéroïde dans une puce microfluidique

---

Une fois que le sphéroïde est en contact avec toute la surface de la chambre de culture, il est entièrement confiné. Le cas est alors comparable à celui où un sphéroïde est entièrement inclus dans un hydrogel en agarose. Nous avons décalé la courbe en temps (24h) et en pression (250Pa) pour l'agarose (en noire) pour la comparer avec la dynamique des pressions de croissance mesurée dans le cas du dispositif microfluidique : nous observons une dynamique similaire. La baisse de pression observée pour les derniers points de la courbe agarose peut être due au fait que le sphéroïde n'est plus alimenté convenablement (sa taille étant supérieure à la taille de chambre microfluidique à la fin de l'expérience).

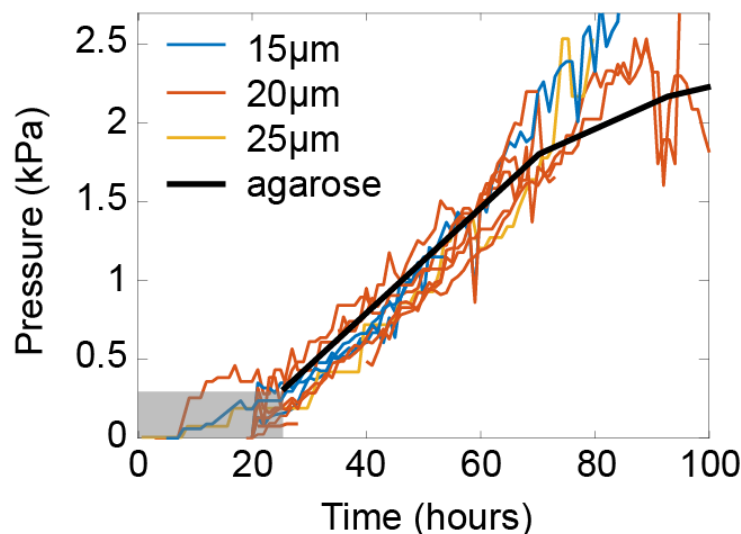


Figure 102 - Courbes de pression obtenues dans le cas d'un sphéroïde en croissance confinée dans la puce (bleu, jaune, orange) et dans le cas d'un sphéroïde en croissance confinée dans un hydrogel (courbe noire).

## Annexe 8 : Détermination de l'ordre de grandeur de la tension de surface en utilisant le passage du sphéroïde d'une forme sphérique à cubique lors des premières heures de croissance dans la puce.

---

Au cours de l'accumulation de la pression induite par la croissance, l'agrégat passe d'une forme sphéroïde à une forme cuboïde, où la courbure diminue du rayon du sphéroïde au rayon d'une cellule, à une pression mécanique donnée. En notant  $P_{\text{ext}}^0$  la pression externe,  $P_{\text{int}}$  la pression interne,  $R$  le rayon de courbure et  $\gamma$  la tension superficielle, l'équation de Laplace de la pression peut s'écrire

$$P_{\text{int}}^0 = P_{\text{ext}}^0 + \frac{2\gamma}{R_0}$$

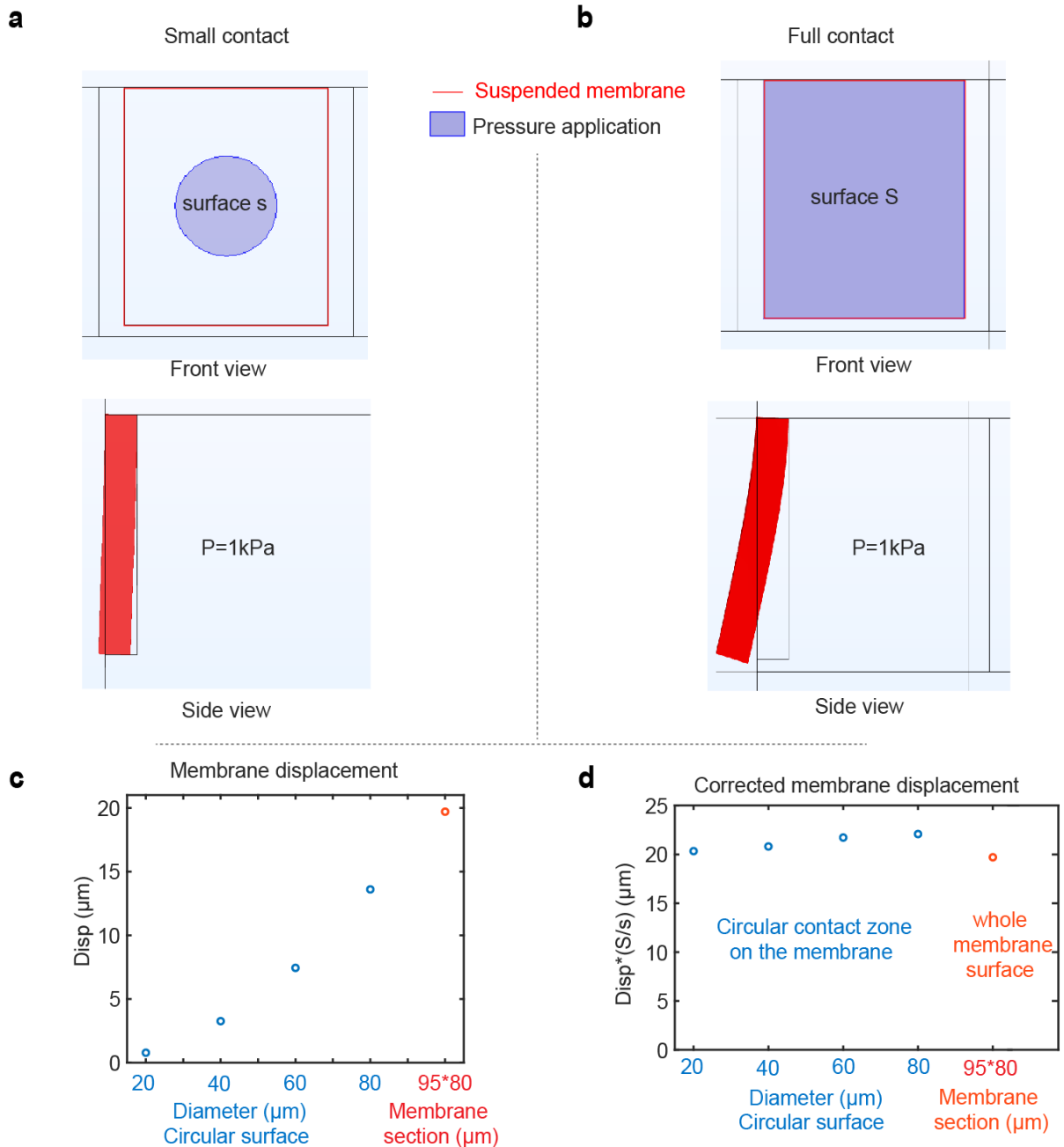
Lorsque l'agrégat est une sphère, avec  $R_0$  son rayon, et

$$P_{\text{int}} = P_{\text{ext}}^0 + P_{\text{mecha}}(R = R_c) = P_{\text{ext}}^0 + \frac{2\gamma}{R_c}$$

lorsque le sphéroïde s'est transformé en une forme cubique avec un rayon de courbure  $R_c$  qui correspond au rayon d'une cellule, et  $P_{\text{mecha}}(R = R_c)$  la pression mécanique à ce point dans le temps.  $P_{\text{mecha}}(R = R_c)$  est la pression mesurée par le capteur de pression. À cette surface, la courbure du sphéroïde est  $\sim 0 \mu\text{m}^{-1}$ , le sphéroïde s'aplatissant sur le capteur. Étant donné que  $P_{\text{mecha}}(R = R_c) \sim 300\text{Pa}$ , et  $R_c \sim 10\mu\text{m}$ , on obtient  $\gamma \sim 1,5 \text{ mN/m}$  comme valeur de tension superficielle.

## Annexe 9 : Facteur de correction pour les pressions mesurées en dessous de 250Pa.

Simulations results for 1kPa pressure



**Figure S7 : Facteur de correction lorsque le sphéroïde n'est pas entièrement en contact avec la membrane.** Lorsque l'agrégat n'entre pas complètement en contact avec la surface, la pression est appliquée sur une surface plus petite. Nous avons effectué des simulations par éléments finis dans lesquelles la surface de contact est soit un petit cercle (aux premiers moments, (a)), soit un contact total avec la surface (à confluence, (b)). Nous avons observé que le déplacement augmentait avec le diamètre de la surface de contact (c). Nous avons montré qu'un facteur de correction du rapport entre la surface de la membrane et la surface de contact doit être appliqué (d). Cependant, comme la membrane ne se déforme pas uniformément, ce facteur de correction n'est pas exactement le rapport des surfaces, et tend à diminuer avec l'augmentation de la surface de contact.

## Annexe 10 : Culture cellulaire

---

La lignée cellulaire A338 est issue d'une tumeur pancréatique murine porteuse d'une mutation activatrice de l'oncogène KRas (KRasG12D) est mise en culture dans du DMEM (Sigma-Aldrich) additionné de 10% de SVF (Sigma-Aldrich) et de 1% de Pénicilline-Streptomycine (Sigma-Aldrich), à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

## Annexe 11 : Détermination des propriétés mécaniques d'un sphéroïde grâce à la technique d'aspiration par micropipette.

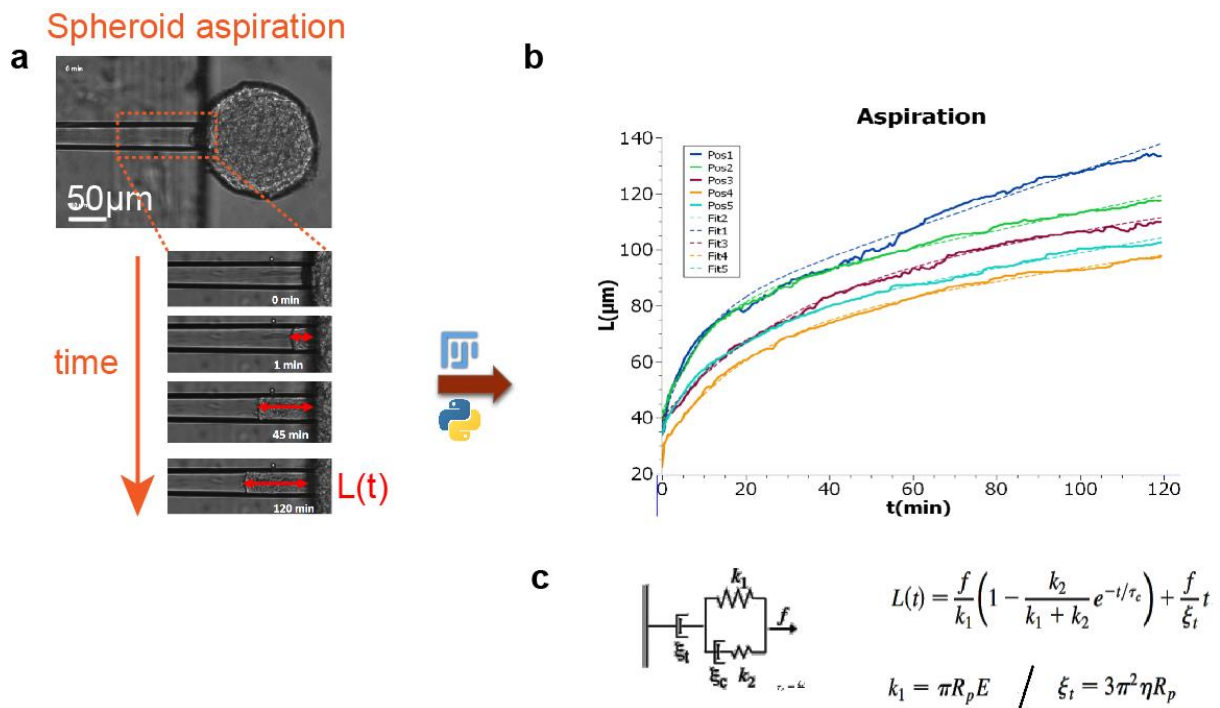


Figure 103 - a. Séquence d'image montrant l'aspiration d'un sphéroïde. b. Mesure de la longueur de la partie aspirée en fonction du temps. c- Modèle mathématique utilisé pour déterminer l'élasticité et la viscosité.



## Annexe 12 : Méthode pour retrouver la variation du rayon d'une cellule, de sa taille initiale à deux fois son volume

---

En considérant que le volume moyen ( $V_m$ ) d'une cellule est calculé à partir de son volume initial ( $V_o$ ) et de son volume au moment de la division ( $2V_o$ ), on a :

$$V_m = \left(\frac{3}{2}\right) * V_o$$

$$V_o = \left(\frac{2}{3}\right) * V_m$$

On remplace maintenant l'expression de  $V_o$  et  $V_m$  à partir du volume d'une sphère dont le rayon vaut respectivement  $R_o$  et  $R_m$  :

$$\left(\frac{4}{3}\right) * \pi * R_o^3 = \left(\frac{2}{3}\right) * \left(\frac{4}{3}\right) * \pi * R_m^3$$

$$R_o^3 = \left(\frac{2}{3}\right) * R_m^3$$

$$R_o^3 = \left(\frac{2}{3}\right) * (4,5)^3$$

$$R_o^3 = 60,75$$

Le rayon initial de la cellule vaut donc :

$$R_o = 3,93 \mu\text{m}$$

Sachant que l'on considère que la cellule double de volume au moment de la division, alors on a le volume à la division ( $V_d$ ) qui vaut :

$$V_d = 2 * V_o$$

$$\left(\frac{4}{3}\right) * \pi * R_d^3 = 2 * \left(\left(\frac{4}{3}\right) * \pi * R_o^3\right)$$

$$R_d^3 = 2 * R_o^3$$

$$R_d^3 = 2 * (3,93)^3$$

Le rayon au moment de la division vaut donc :

$$R_d = 4,95 \mu\text{m}$$

La variation du rayon lorsqu'une cellule double en volume lors de la division vaut alors  $R_d - R_o$  soit  $1,02 \mu\text{m}$ .

## Annexe 13 : Méthode pour retrouver la tension de surface des cellules

---

En utilisant le modèle de coalescence des fluides visqueux décrit dans l'article de Kosheleva et al.,<sup>172</sup>, on part de l'équation :

$$\left(\frac{ro}{Ro}\right)^2 = 2^{\frac{2}{3}} * \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right)$$

Avec :

- ro, le rayon mesuré à partir de la zone de contact entre les deux sphéroïdes (qui est circulaire en 3D).
- Ro le rayon moyen des deux sphéroïdes.
- t, la variable qui représente le temps
- $\tau$  la constante de temps.

En utilisant un développement limité du 1er ordre, on a  $e^{-\frac{t}{\tau}} = 1 - \left(\frac{t}{\tau}\right)$

$$\left(\frac{ro}{Ro}\right)^2 = 2^{\frac{2}{3}} * \left(1 - \left(1 - \frac{t}{\tau}\right)\right)$$

$$\left(\frac{ro}{Ro}\right)^2 = 2^{\frac{2}{3}} * \left(\frac{t}{\tau}\right)$$

$$ro^2 = Ro^2 * 2^{\frac{2}{3}} * \frac{t}{\tau}$$

La constante de temps  $\tau$  a une expression aux temps courts qui vaut :

$$\tau = 2^{\frac{2}{3}} * Ro * \left(\frac{\eta}{\gamma}\right)$$

En remplaçant son expression dans l'équation précédente, on trouve :

$$r_o^2 = \frac{\left( R_o^2 * 2^{\frac{2}{3}} * t * \gamma \right)}{2^{\frac{2}{3}} * R_o * \eta}$$

$$r_o^2 = \frac{(R_o * \gamma)}{\eta} t$$

Expérimentalement, j'ai tracé  $r_o^2=f(t)$ , ce qui m'a donné une droite affine dont le coefficient directeur est :

$$a = \frac{R_o * \gamma}{\eta}$$

On trouve finalement la tension de surface, qui vaut :

$$\gamma = \frac{(a * \eta)}{R_o}$$

Pour la lignée HeLa, j'ai trouvé  $\gamma = 0,9mN/m$

## Annexe 14 : Protocole permettant l'infection des cellules à 2D

Le virus utilisé est le SG33 Santaka (marqué en rouge) dont la titration virale est  $5.10^6$  PFU/mL.

$$MOI \text{ pour } 1\mu\text{L de virus} = \frac{\text{Titration virale (en } \mu\text{L})}{\text{Nombre de cellules à infecter}} = \frac{5.10^3}{350\,000} = 0.014$$

Soit, MOI 0.014 = 1 $\mu$ L de SG33 Santaka

Donc MOI 10 = 714 $\mu$ L de SG33 Santaka

Protocole d'infection :

- Faire décongeler le virus et sortir le milieu du frigo au préalable (milieu DMEM complet – 10% SVF, 1% antibiotiques)
- Faire les calculs d'infection, pour un volume total de 3mL dans chaque puit :
  - MOI 10 = 714 $\mu$ L de SG33 + 2286 $\mu$ L de DMEM
  - MOI 5 = 357 $\mu$ L de SG33 + 2643 $\mu$ L de DMEM
  - MOCK = 3mL de DMEM
- Préparer 3 falcons de 15mL avec les dilutions des calculs précédents
- Aspirer le milieu des cellules
- Mettre les 3mL du milieu d'infection (ou MOCK) dans chaque boîte correspondante
- Incuber 1h à 37°C
- Aspirer le milieu d'infection
- Mettre 3mL de milieu DMEM complet
- Laisser dans l'incubateur à 37°C jusqu'au moment de l'imagerie.

## Annexe 15 : Morphologie des cellules en fonction de la rigidité des substrats

---

0,5kPa

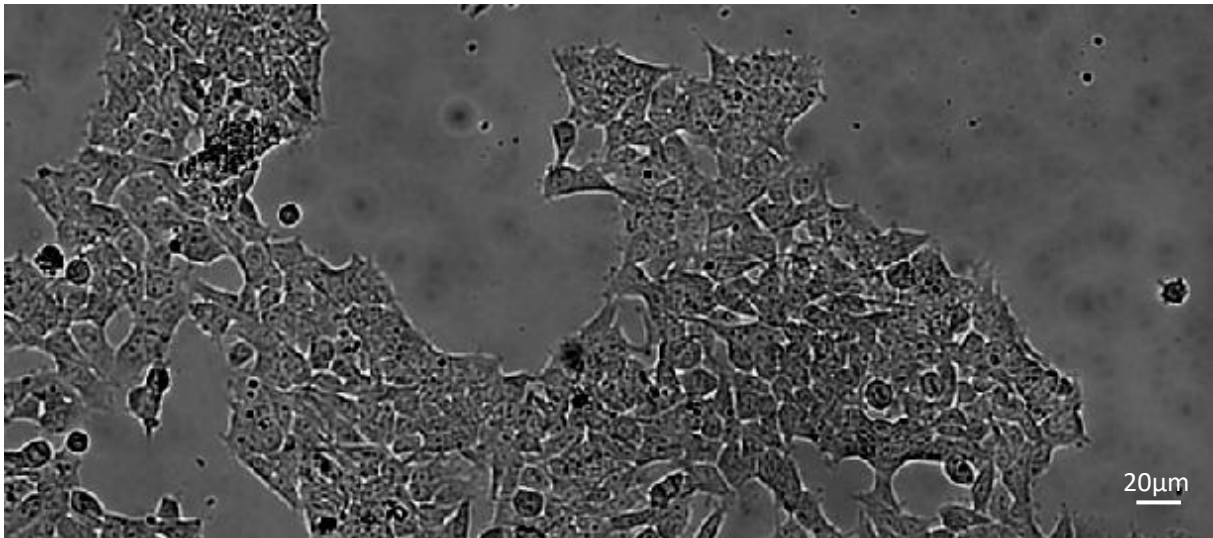


Figure 104 - Image en lumière blanche des cellules au début de l'infection cultivée sur un substrat d'une rigidité de 0,5kPa.

16kPa

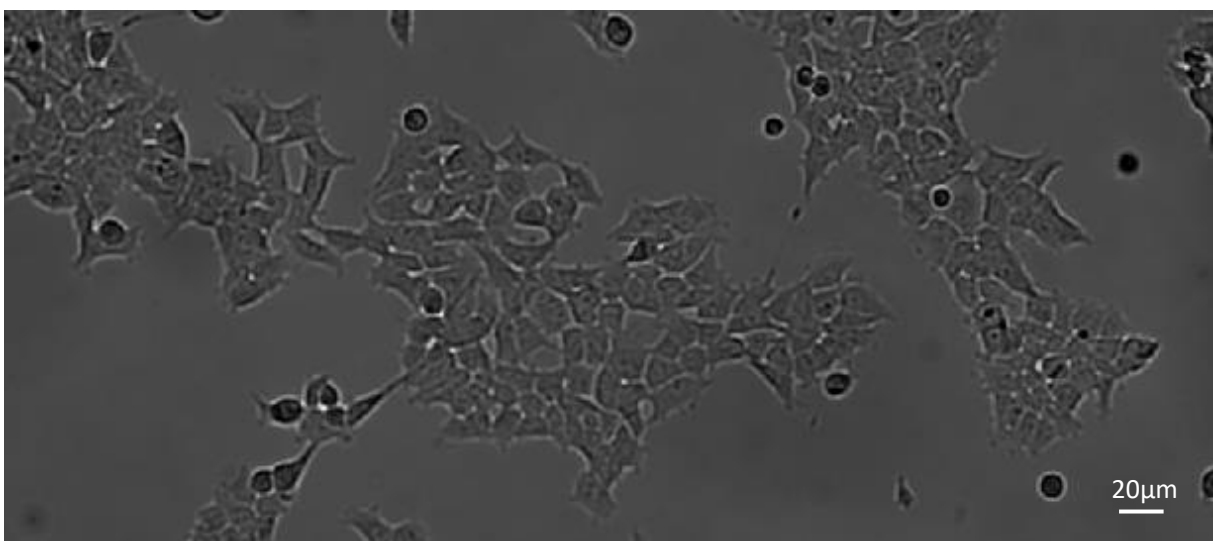


Figure 105 - Image en lumière blanche des cellules au début de l'infection cultivée sur un substrat d'une rigidité de 16kPa.

GPa (Plastique)

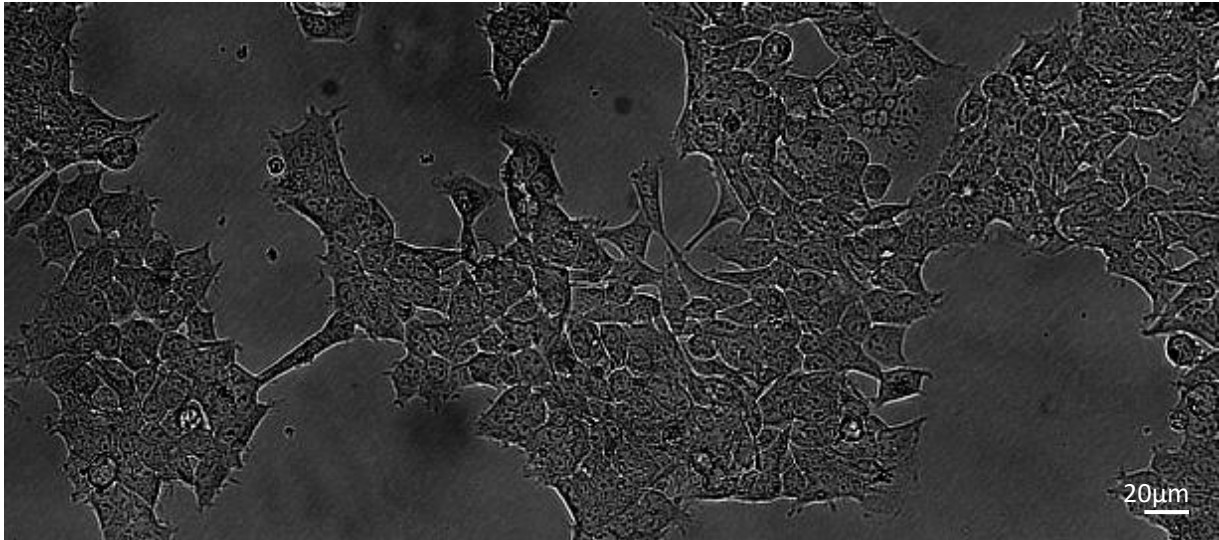


Figure 106 - mage en lumière blanche des cellules au début de l'infection cultivée sur un substrat d'une rigidité de l'ordre du GPa (plastique).

## Résumé

---

- En Français :

Dans une tumeur solide, les cellules cancéreuses forment une masse dont le volume est limité spatialement par le tissu qui l'entoure. La tumeur subit des contraintes compressives qui proviennent de son micro environnement et qui sont notamment induites par sa croissance. Dans le cas du cancer du pancréas, ces contraintes sont importantes et peuvent atteindre l'ordre du kilopascal. Elles ont une influence considérable sur la division cellulaire, la croissance ainsi que la motilité des cellules, entraînant potentiellement l'inefficacité de certains médicaments.

Malgré l'importance de ces études, peu de recherches ont été menées sur la compréhension des mécanismes inhérents à la réponse sous compression. Nous avons mis au point des dispositifs microfluidiques permettant de confiner spatialement des modèles de sous-unités tumorales, appelés sphéroïdes. Chacune des chambres de culture comporte un capteur (membrane) sensible à la pression induite par la croissance des cellules.

Par ailleurs, nous avons initié des essais sur un traitement prometteur qui pourrait permettre de contourner l'inefficacité sous contrainte mécanique de thérapies usuelles : les virus oncolytiques.

Grâce au dispositif microfluidique, nous avons pu cultiver des sphéroïdes pendant 5 jours et mesurer des pressions de croissance allant de 0 à 3kPa. En utilisant une lignée cellulaire marquée avec le vecteur FUCCI permettant de mesurer les phases du cycle cellulaire, nous avons observé sous l'effet de la pression de croissance, une accumulation de cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire. Nous avons également pu étudier l'impact de cette pression sur l'encombrement macromoléculaire présent dans le cytoplasme des cellules en réalisant des mesures rhéologiques, faites au moyen de nanoparticules génétiquement exprimées par les cellules (GEMs). Nous avons observé une diminution de la diffusion des nanoparticules à mesure que la pression de croissance augmentait dans les chambres de culture. Ces résultats suggèrent que la concentration en macromolécules augmente en parallèle de la pression de croissance.

Afin de caractériser la croissance des cellules au sein d'un sphéroïde, nous avons réalisé des simulations à partir d'un modèle par éléments finis simple. Ce dernier met en évidence la présence d'un gradient de pression dans un sphéroïde qui faciliterait vraisemblablement la division des cellules en sa périphérie. De plus, en réalisant des marquages en

immunofluorescence de la protéine Ki-67, nous avons observé une majorité de cellules en division en bordure des sphéroïdes. Nous avons également réalisé des mesures rhéologiques sur des cellules localisées à différentes positions le long du rayon des sphéroïdes. Les résultats montrent un gradient de diffusion, allant de  $0,55\mu\text{m}^2/\text{s}$  pour des cellules présentes au bords du sphéroïde à  $0,3\mu\text{m}^2/\text{s}$  pour des cellules situées au cœur du sphéroïde.

Enfin, nous avons pu comparer la dynamique d'infection des virus oncolytiques sur des cellules cultivées à 2D sur des substrats de différentes rigidités. Sur du plastique, la dynamique d'infection obtenue est légèrement plus rapide que sur un substrat mou ( $E=0,5\text{kPa}$ ). Par ailleurs, lorsque les cellules sont cultivées à 2D sous l'effet d'une compression mécanique, les résultats montrent un important retard (40h) sur le début de l'infection.

Pour conclure, nous avons pu mesurer la pression de croissance des sphéroïdes au moyen d'une puce microfluidique et étudier son impact sur la croissance des cellules et l'encombrement macromoléculaire. Des résultats préliminaires sur les virus oncolytiques montrent une dépendance de l'infection plus ou moins forte en fonction du type de contraintes mécaniques appliquées sur les cellules. Ces travaux apportent une nouvelle perspective méthodologique sur le confinement spatial de sphéroïdes et soulèvent des questions supplémentaires quant à la compréhension des mécanismes caractérisant la réponse cellulaire sous compression.

- En anglais :

In a solid tumor, cancer cells form a mass where the volume is spatially limited by the surrounding tissue. The tumor undergoes compressive stresses that originate from its microenvironment and are induced in particular by its growth. In the case of pancreatic cancer, these stresses are significant and can reach the kilopascal range. They have a considerable influence on cell division, growth and cell motility, potentially leading to the inefficiency of certain drugs.

Despite the importance of these studies, few researches have been carried out into understanding the mechanisms inherent in the response under compression. We have developed microfluidic devices to spatially confining tumor subunit models, known as spheroids. Each of the culture chambers contains a sensor (membrane) sensitive to the pressure induced by cell growth.



We have also initiated experiments on a promising treatment which could circumvent the apparent inefficacy of conventional therapies under mechanical stress: oncolytic viruses.

Using the microfluidic device, we were able to culture spheroids for 5 days and measure growth-induced pressures ranging from 0 to 3kPa. Using a cell line labelled with the FUCCI vector for measuring the phases of the cell cycle, we observed an accumulation of cells in the G1 phase of the cell cycle under the effect of growth-induced pressure. We were also able to study the impact of this pressure on macromolecular crowding present in the cytoplasm of the cells by carrying out rheological measurements using nanoparticles genetically expressed by the cells (GEMs). We observed a decrease in nanoparticle diffusion as the growth-induced pressure increased in the culture chambers. These results suggest that the concentration of macromolecules increases in parallel with the growth-induced pressure.

In order to characterize the growth of cells within a spheroid, we carried out simulations using a simple finite element model. It revealed the presence of a pressure gradient in a spheroid that likely facilitate cell division at its periphery. In addition, by immunofluorescence labelling of the Ki-67 protein, we observed a majority of dividing cells at the edges of spheroids. We also carried out rheological measurements on cells located at different positions along the radius of the spheroids. Results show a diffusion gradient ranging from  $0.55\mu\text{m}^2/\text{s}$  for cells at the edge of the spheroid to  $0.3\mu\text{m}^2/\text{s}$  for cells located at the heart of the spheroid.

Finally, we were able to compare the infection dynamics of oncolytic viruses on cells grown in 2D on substrates of different rigidity. On plastic, the infection dynamics obtained was slightly faster than one on a soft substrate ( $E=0.5\text{kPa}$ ). Furthermore, when the cells were cultured at 2D under the effect of mechanical compression, the results showed a significant delay (40h) on the beginning of infection.

In conclusion, we were able to measure spheroid growth-induced pressure using a microfluidic chip and study its impact on cell growth and macromolecular crowding. Results on oncolytic viruses show that infection depends to a greater or lesser extent on the type of mechanical stress applied to the cells. This work provides a new methodological perspective on the spatial confinement of spheroids and raises further questions about our understanding of the mechanisms characterizing the cellular response under compression.

## Références bibliographiques

---

1. Andrés-Delgado, L. & Mercader, N. Interplay between cardiac function and heart development. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 1707–1716 (2016).
2. Houtekamer, R. M., Van Der Net, M. C., Maurice, M. M. & Gloerich, M. Mechanical forces directing intestinal form and function. *Curr. Biol.* **32**, R791–R805 (2022).
3. Brábek, J., Mierke, C. T., Rösel, D., Veselý, P. & Fabry, B. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Commun. Signal.* **8**, 1–8 (2010).
4. Du Roure, O. *et al.* Force mapping in epithelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2390–2395 (2005).
5. Melo-Fonseca, F., Carvalho, O., Gasik, M., Miranda, G. & Silva, F. S. Mechanical stimulation devices for mechanobiology studies: a market, literature, and patents review. *Bio-Design Manuf.* **6**, 340–371 (2023).
6. Gans, C. & Gaunt, A. S. Muscle architecture in relation to function. *J. Biomech.* **24**, 53–65 (1991).
7. Malacinski, G. M. & Neff, A. W. The influence of gravity on the process of development of animal systems. *Adv. Sp. Res.* **4**, 315–323 (1984).
8. Ross, M. D. The influence of gravity on structure and function of animals. *Adv. Sp. Res.* **4**, 305–314 (1984).
9. Morrison, J. B. The mechanics of the knee joint in relation to normal walking. *J. Biomech.* **3**, 51–61 (1970).
10. EVANS, J. H. & BARBENEL, J. C. Structural and Mechanical Properties of Tendon related to Function. *Equine Vet. J.* **7**, 1–8 (1975).
11. Mansour, J. M. Biomechanics of cartilage. (2013).
12. Hargens, A. R. The Gravity of Giraffe Physiology. (1997).
13. García-Aznar, J. M., Nasello, G., Hervas-Raluy, S., Pérez, M. Á. & Gómez-Benito, M. J. Multiscale modeling of bone tissue mechanobiology. *Bone* **151**, 116032 (2021).
14. Pollard, T. D. & Borisy, G. G. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* **112**, 453–465 (2003).
15. Lodish, H. F. & Darnell, J. E. *Molecular Cell Biology.* (1995).
16. Pollard, T. D. & Goldman, R. D. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).
17. Sanhaji, M. *et al.* Mitotic centromere-associated kinesin (MCAK): a potential cancer drug target. *Oncotarget* **2**, 935–947 (2011).

18. Schwartzman, J. M., Sotillo, R. & Benezra, R. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat. Rev. Cancer* 2010 102 **10**, 102–115 (2010).
19. Omary, M. B., Coulombe, P. A. & McLean, W. H. I. Intermediate Filament Proteins and Their Associated Diseases. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040319> **351**, 2087–2100 (2004).
20. Dutour-Provenzano, G., Biology, S. E.-M.-C. & 2021, undefined. Intermediate filaments. *cell.com* **31**, R522–R529 (2021).
21. Tamkun, J. W. *et al.* Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **46**, 271–282 (1986).
22. Lekka, M., Gnanachandran, K., Kubiak, A., Zieliński, T. & Zemła, J. Traction force microscopy – Measuring the forces exerted by cells. *Micron* **150**, 103138 (2021).
23. Israels, E. D. & Israels, L. G. The Cell Cycle. *Oncologist* **5**, 510–513 (2000).
24. Murray, A. Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 872–876 (1994).
25. Hulleman, E. & Boonstra, J. Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 80–93 (2001).
26. Taubenberger, A. V., Baum, B. & Matthews, H. K. The Mechanics of Mitotic Cell Rounding. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 560287 (2020).
27. Sorce, B. *et al.* Mitotic cells contract actomyosin cortex and generate pressure to round against or escape epithelial confinement. *Nat. Commun.* 2015 61 **6**, 1–12 (2015).
28. Stewart, M. P. *et al.* Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nat.* 2010 4697329 **469**, 226–230 (2011).
29. Cattin, C. J. *et al.* Mechanical control of mitotic progression in single animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11258–11263 (2015).
30. Nam, S. & Chaudhuri, O. Mitotic cells generate protrusive extracellular forces to divide in three-dimensional microenvironments. *Nat. Phys.* 2018 146 **14**, 621–628 (2018).
31. Gupta, V. K. & Chaudhuri, O. Mechanical regulation of cell-cycle progression and division. *Trends Cell Biol.* **32**, 773–785 (2022).
32. Guo, M. *et al.* Cell volume change through water efflux impacts cell stiffness and stem cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E8618–E8627 (2017).
33. Wang, J. H. C. & Li, B. Mechanics rules cell biology. *Sport. Med. Arthrosc. Rehabil. Ther. Technol.* **2**, 1–7 (2010).

34. Goodwin, K. & Nelson, C. M. Mechanics of Development. *Dev. Cell* **56**, 240–250 (2021).
35. Stooke-Vaughan, G. A. & Campàs, O. Physical control of tissue morphogenesis across scales. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **51**, 111–119 (2018).
36. Waters, C. M., Roan, E. & Navajas, D. Mechanobiology in Lung Epithelial Cells: Measurements, Perturbations, and Responses. *Compr. Physiol.* **2**, 1 (2012).
37. Malek, A. M. & Izumo, S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J. Cell Sci.* **109**, 713–726 (1996).
38. Heo, J., Sachs, F., Wang, J. & Hua, S. Z. Shear-induced volume decrease in MDCK cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **30**, 395–406 (2012).
39. Dejak, B., Młotkowski, A. & Romanowicz, M. Finite element analysis of stresses in molars during clenching and mastication. *J. Prosthet. Dent.* **90**, 591–597 (2003).
40. Helmlinger, G., Netti, P. A., Lichtenbeld, H. C., Melder, R. J. & Jain, R. K. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat. Biotechnol.* **15**, 778–783 (1997).
41. Alessandri, K. *et al.* Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 14843–14848 (2013).
42. Rizzuti, I. F. *et al.* Mechanical Control of Cell Proliferation Increases Resistance to Chemotherapeutic Agents. *Phys. Rev. Lett.* **125**, (2020).
43. Taubenberger, A. V. *et al.* 3D Microenvironment Stiffness Regulates Tumor Spheroid Growth and Mechanics via p21 and ROCK. *Adv. Biosyst.* **3**, (2019).
44. French, A. S. Mechanotransduction. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.001031> **54**, 135–152 (2003).
45. Kuo, J. C. Focal Adhesions Function as a Mechanosensor. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **126**, 55–73 (2014).
46. Farge, E. Mechanical Induction of Twist in the Drosophila Foregut/Stomodaeal Primordium. *Curr. Biol.* **13**, 1365–1377 (2003).
47. Zhao, B., Tumaneng, K. & Guan, K. L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **13**, 877–883 (2011).
48. Martinac, B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J. Cell Sci.* **117**, 2449–2460 (2004).
49. Coste, B. *et al.* Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct

- mechanically activated cation channels. *Science* (80-. ). **330**, 55–60 (2010).
50. Fang, X. Z. *et al.* Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell Biosci.* 2021 111 **11**, 1–20 (2021).
  51. Coste, B. Les protéines Piezo forment une nouvelle famille de canaux ioniques activés mécaniquement. *médecine/sciences* **28**, 1056–1057 (2012).
  52. Ranade, S. S. *et al.* Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 10347–10352 (2014).
  53. Nam, S. *et al.* Cell cycle progression in confining microenvironments is regulated by a growth-responsive TRPV4-PI3K/Akt-p27Kip1 signaling axis. *Sci. Adv.* **5**, (2019).
  54. Holt, L. J. & Delarue, M. Macromolecular crowding: Sensing without a Sensor. *Curr. Opin. Cell Biol.*
  55. Delarue, M. *et al.* mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding. *Cell* **174**, 338-349.e20 (2018).
  56. Van Den Berg, J., Boersma, A. J. & Poolman, B. Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017 155 **15**, 309–318 (2017).
  57. Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 597–604 (2001).
  58. Bonucci, M., Shu, T. & Holt, L. J. How it feels in a cell. *Trends Cell Biol.* (2023) doi:10.1016/J.TCB.2023.05.002.
  59. Alric, B., Formosa-Dague, C., Dague, E., Holt, L. & Delarue M. Macromolecular crowding limits growth under pressure. *Nat. Phys.* (2022) doi:10.1101/2021.06.04.446859.
  60. Crisp, M. *et al.* Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* **172**, 41–53 (2006).
  61. Sosa, B. A., Kutay, U. & Schwartz, T. U. Structural insights into LINC complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 285–291 (2013).
  62. Stroud, M. J., Banerjee, I., Veevers, J. & Chen, J. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex proteins in cardiac structure, function, and disease. *Circ. Res.* **114**, 538–548 (2014).
  63. Alcorta-Sevillano, N., Macías, I., Rodríguez, C. I. & Infante, A. Crucial Role of Lamin A/C in the Migration and Differentiation of MSCs in Bone. *Cells* **9**, (2020).
  64. Banerjee, I. *et al.* Targeted Ablation of Nesprin 1 and Nesprin 2 from

- Murine Myocardium Results in Cardiomyopathy, Altered Nuclear Morphology and Inhibition of the Biomechanical Gene Response. *PLoS Genet.* **10**, e1004114 (2014).
65. Jaalouk, D. E. & Lammerding, J. Mechanotransduction gone awry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009 101 **10**, 63–73 (2009).
  66. Lombardi, M. L. & Lammerding, J. Keeping the LINC: the importance of nucleocytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1729–1734 (2011).
  67. Définition de oncogenèse | Dictionnaire français. <https://www.lalanguefrancaise.com/dictionnaire/definition/oncogenese>.
  68. Basu, A. K. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, Vol. 19, Page 970 **19**, 970 (2018).
  69. Tompa, A., Major, J. & G., M. Application of UV-Induced Unscheduled DNA-Synthesis Measurements in Human Genotoxicological Risk Assessment. *DNA Repair Hum. Heal.* (2011) doi:10.5772/21021.
  70. Cazaux, C. L'instabilité génétique, moteur de l'oncogenèse. *Bull. Cancer* **97**, 1241–1251 (2010).
  71. Adm, P. D.-H. & 2004, undefined. Basics of carcinogenesis. *Acad. DeviHealth Adm, 2004•academia.edu*.
  72. *Rôle du microenvironnement dans la tumorigenèse et la progression tumorale. Collection Rapports sur les avancées, ouvrage collectif édité par La Fondation ARC pour la recherche sur le cancer et l'INCa, Boulogne-Billancourt, avril 2013.*
  73. DE, P. Physiopathologie du pancréas: Rôle de l'inflammation dans la cancérogenèse du pancréas exocrine. (1989).
  74. Therville, N. *et al.* Experimental pancreatic cancer develops in soft pancreas: novel leads for an individualized diagnosis by ultrafast elasticity imaging. *Theranostics* **9**, 6369 (2019).
  75. Yuan, S., Norgard, R. J. & Stanger, B. Z. Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discov.* **9**, 837–851 (2019).
  76. Comment une cellule devient cancéreuse ? - La Ligue contre le cancer - Comité de Côte-d'Or. <http://www.ligue-cancer21.info/actualites/comment-une-cellule-devient-elle-cancereuse/>.
  77. Yokota, J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21**, 497–503 (2000).
  78. Lemaire, J., Larrue, R., Perrais, M., Cauffiez, C. & Pottier, N. Aspects fondamentaux du développement tumoral. *Bull. Cancer* **107**, 1148–1160 (2020).
  79. Giancotti, F. G. Deregulation of cell signaling in cancer. *FEBS Lett.* **588**, 2558–2570 (2014).

80. Avizienyte, E. & Frame, M. C. Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 542–547 (2005).
81. Mitra, S. K. & Schlaepfer, D. D. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 516–523 (2006).
82. Zakaria, M. A., Rajab, N. F., Chua, E. W., Selvarajah, G. T. & Masre, S. F. The Roles of Tissue Rigidity and Its Underlying Mechanisms in Promoting Tumor Growth. *Cancer Invest.* **38**, 445–462 (2020).
83. Gargalionis, A. N., Papavassiliou, K. A. & Papavassiliou, A. G. Mechanobiology of solid tumors. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1868**, 166555 (2022).
84. Gkretsi, V. & Stylianopoulos, T. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front. Oncol.* **8**, 145 (2018).
85. Lièvre, A. & Laurent-Puig, P. La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro Dig.* **II**, (2010).
86. Di-Luoffo, M., Ben-Meriem, Z., Lefebvre, P., Delarue, M. & Guillermet-Guibert, J. PI3K functions as a hub in mechanotransduction. (2021) doi:10.1016/j.tibs.2021.05.005.
87. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010 115 11**, 329–341 (2010).
88. Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Role of Phosphoinositide 3-OH Kinase in Cell Transformation and Control of the Actin Cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**, 457–467 (1997).
89. Levental, K. R. *et al.* Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* **139**, 891–906 (2009).
90. Rubashkin, M. G. *et al.* Force Engages Vinculin and Promotes Tumor Progression by Enhancing PI3K Activation of Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphate. *Cancer Res.* **74**, 4597–4611 (2014).
91. Kalli, M. *et al.* Solid stress-induced migration is mediated by GDF15 through Akt pathway activation in pancreatic cancer cells. *Sci. Reports* **2019 91 9**, 1–12 (2019).
92. Kim, B. G. *et al.* Compression-induced expression of glycolysis genes in CAFs correlates with EMT and angiogenesis gene expression in breast cancer. *Commun. Biol.* **2019 21 2**, 1–15 (2019).
93. Boukhalfa, A., Nascimbeni, A. C., Dupont, N., Codogno, P. & Morel, E. Primary cilium-dependent autophagy drafts PIK3C2A to generate PtdIns3P in response to shear stress. *Autophagy* **16**, 1143–1144 (2020).
94. Mountford, J. K. *et al.* The class II PI 3-kinase, PI3KC2 $\alpha$ , links platelet internal membrane structure to shear-dependent adhesive function. *Nat.*

- Commun.* 2015 61 **6**, 1–14 (2015).
95. Noguchi, S. *et al.* An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4660–4672 (2014).
  96. Siew, W. C. *et al.* A Role for TAZ in Migration, Invasion, and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **68**, 2592–2598 (2008).
  97. Diep, C. H. *et al.* Down-Regulation of Yes Associated Protein 1 Expression Reduces Cell Proliferation and Clonogenicity of Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One* **7**, e32783 (2012).
  98. Zanconato, F., Cordenonsi, M., cell, S. P.-C. & 2016, undefined. YAP/TAZ at the roots of cancer. *cell.com*.
  99. Nguyen, C. D. K. & Yi, C. YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Trends in Cancer* **5**, 283–296 (2019).
  100. Kim, M. H. & Kim, J. Role of YAP/TAZ transcriptional regulators in resistance to anti-cancer therapies. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016 748 **74**, 1457–1474 (2016).
  101. Boedtkjer, E. & Pedersen, S. F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034627> **82**, 103–126 (2020).
  102. Warburg, O. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. *Science (80- )*. **124**, 269–270 (1956).
  103. Hashim, A. I., Zhang, X., Wojtkowiak, J. W., Martinez, G. V. & Gillies, R. J. Imaging pH and metastasis. *NMR Biomed.* **24**, 582–591 (2011).
  104. Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D., Harris, A. L. & Hulikova, A. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, (2014).
  105. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2016).
  106. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2007 81 **8**, 56–61 (2008).
  107. Gillies, R. J., Verduzco, D. & Gatenby, R. A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat. Rev. Cancer* 2012 127 **12**, 487–493 (2012).
  108. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 2004 411 **4**, 891–899 (2004).
  109. Helmlinger, G., Netti, P. A., Lichtenbeld, H. C., Melder, R. J. & Jain, R. K. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat. Biotechnol.* 1997 158 **15**, 778–783 (1997).
  110. Cheng, G., Tse, J., Jain, R. K. & Munn, L. L. Micro-Environmental



- Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells. *PLoS One* **4**, e4632 (2009).
111. Sheikh, R., Walsh, N., Clynes, M., Oconnor, R. & McDermott, R. Challenges of drug resistance in the management of pancreatic cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **10**, 1647–1661 (2010).
  112. Di Maggio, F. & El-Shakankery, K. H. Desmoplasia and Biophysics in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Can We Learn from Breast Cancer? *Pancreas* **49**, 313–325 (2020).
  113. Weniger, M., Honselmann, K. C. & Liss, A. S. The Extracellular Matrix and Pancreatic Cancer: A Complex Relationship. *Cancers 2018, Vol. 10, Page 316* **10**, 316 (2018).
  114. Hadden, M. *et al.* Mechanically stressed cancer microenvironment: Role in pancreatic cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1874**, 188418 (2020).
  115. Rizzuti, I. F. *et al.* Mechanical control of cell proliferation increases resistance to chemotherapeutic agents. *Phys. Rev. Lett.* **125**, 128103 (2020).
  116. Huh, D. *et al.* Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science (80-. )*. **328**, 1662–1668 (2010).
  117. Bourn, M. D. *et al.* High-throughput microfluidics for evaluating microbubble enhanced delivery of cancer therapeutics in spheroid cultures. *J. Control. Release* **326**, 13–24 (2020).
  118. Sutherland, R. M. Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions: The Multicell Spheroid Model. *Science (80-. )*. **240**, 177–184 (1988).
  119. Sutherland, R. M. Importance of Critical Metabolites and Cellular Interactions in the Biology of Microregions of Tumors. *Cancer* **58**, 1668–1680 (1986).
  120. Montel, F. *et al.* Isotropic stress reduces cell proliferation in tumor spheroids. *New J. Phys.* **14**, 055008 (2012).
  121. King, J. S., Veltman, D. M. & Insall, R. H. The induction of autophagy by mechanical stress. *Autophagy* **7**, 1490–1499 (2011).
  122. Tse, J. M. *et al.* Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. doi:10.1073/pnas.1118910109.
  123. Luo, M. *et al.* Compression enhances invasive phenotype and matrix degradation of breast Cancer cells via Piezo1 activation. *BMC Mol. Cell Biol.* **23**, 1–17 (2022).
  124. Nia, H. T. *et al.* Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 0004 (2017).

125. Cheng, G., Tse, J., Jain, R. K. & Munn, L. L. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One* **4**, (2009).
126. Trujillo-de Santiago, G. *et al.* The Tumor-on-Chip: Recent Advances in the Development of Microfluidic Systems to Recapitulate the Physiology of Solid Tumors. *Materials (Basel)*. **12**, 2945 (2019).
127. Aoun, L. *et al.* Microdevice arrays of high aspect ratio poly(dimethylsiloxane) pillars for the investigation of multicellular tumour spheroid mechanical properties. *Lab Chip* **14**, 2344–2353 (2014).
128. Aoun, L. *et al.* Measure and characterization of the forces exerted by growing multicellular spheroids using microdevice arrays. *PLoS One* **14**, e0217227 (2019).
129. Wyld, L., Audisio, R. A. & Poston, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2014 122 **12**, 115–124 (2014).
130. Debela, D. T. *et al.* New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* **9**, (2021).
131. Moses, M. A., Brem, H. & Langer, R. Advancing the field of drug delivery: Taking aim at cancer. *Cancer Cell* **4**, 337–341 (2003).
132. Guse, K., Cerullo, V., biological, A. H.-E. opinion on & 2011, undefined. Oncolytic vaccinia virus for the treatment of cancer. *Taylor Fr. Guse, V Cerullo, A HemminkiExpert Opin. Biol. Ther.* 2011•*Taylor Fr.* **11**, 595–608 (2011).
133. Geletneky, K., Nüesch, J., ... A. A.-C. opinion in & 2015, undefined. Double-faceted mechanism of parvoviral oncosuppression. *Elsevier*.
134. Lawler, S. E., Speranza, M. C., Cho, C. F. & Chiocca, E. A. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol.* **3**, 841–849 (2017).
135. Feola, S., Russo, S., Ylösmäki, E. & Cerullo, V. Oncolytic ImmunoViroTherapy: A long history of crosstalk between viruses and immune system for cancer treatment. *Pharmacol. Ther.* **236**, 108103 (2022).
136. Li, R., Zhang, J., Gilbert, S. M., Conejo-Garcia, J. & Mulé, J. J. Using oncolytic viruses to ignite the tumour immune microenvironment in bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2021 189 **18**, 543–555 (2021).
137. Zhang, S. & Rabkin, S. D. The discovery and development of oncolytic viruses: are they the future of cancer immunotherapy? *Expert Opin. Drug Discov.* **16**, 391–410 (2021).
138. SOUTHAM, C. M. DIVISION OF MICROBIOLOGY: PRESENT STATUS OF ONCOLYTIC VIRUS STUDIES\*. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **22**, 657–673

- (1960).
139. Kelly, E. & Russell, S. J. History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering. *Mol. Ther.* **15**, 651–659 (2007).
  140. Rahman, M. M. & McFadden, G. Oncolytic Viruses: Newest Frontier for Cancer Immunotherapy. *Cancers 2021, Vol. 13, Page 5452* **13**, 5452 (2021).
  141. White, E. Regulation of Apoptosis by Adenovirus E1A and E1B Oncogenes. *Semin. Virol.* **8**, 505–513 (1998).
  142. Atherton, M. J. & Lichty, B. D. Evolution of oncolytic viruses: novel strategies for cancer treatment. <https://doi.org/10.2217/imt.13.123> **5**, 1191–1206 (2013).
  143. Quillien, L. Caractérisation de la réplication et activité oncolytique de SG33 dérivé du Myxoma virus dans des modèles de cancer du pancréas. (2021).
  144. Johnston, J. B. *et al.* Myxoma Virus M-T5 Protects Infected Cells from the Stress of Cell Cycle Arrest through Its Interaction with Host Cell Cullin-1. *J. Virol.* **79**, 10750–10763 (2005).
  145. Li, R., Zhang, J., Gilbert, S. M., Conejo-Garcia, J. & Mulé, J. J. Using oncolytic viruses to ignite the tumour immune microenvironment in bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2021** *189* **18**, 543–555 (2021).
  146. Ylösmäki, E. & Cerullo, V. Design and application of oncolytic viruses for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **65**, 25–36 (2020).
  147. Fluckiger, A. *et al.* Cross-reactivity between tumor MHC class I–restricted antigens and an enterococcal bacteriophage. *Science (80-. )*. **369**, 936–942 (2020).
  148. Venzac, B. *et al.* Sliding walls: a new paradigm for fluidic actuation and protocol implementation in microfluidics. *Microsystems Nanoeng.* **6**, 1–10 (2020).
  149. Aoun, L. *et al.* Measure and characterization of the forces exerted by growing multicellular spheroids using microdevice arrays. *PLoS One* **14**, e0217227 (2019).
  150. Gonzalez-Rodriguez, D., Guevorkian, K., Douezan, S. & Brochard-Wyart, F. Soft matter models of developing tissues and tumors. *Science (80-. )*. **338**, 910–917 (2012).
  151. Belgroune, N., Majlis, B. Y., Hassen-Bey, A. & Benamar, M. E. A. Modeling and FEM simulation using fluid-structures interaction of flexible micro-bridge bending within PDMS micro-channel. *IEEE Int. Conf. Semicond. Electron. Proceedings, ICSE* 495–498 (2014) doi:10.1109/SMELEC.2014.6920906.
  152. Nguyen, T. V., Tanii, R., Takahata, T. & Shimoyama, I. Development of a single-chip elasticity sensor using MEMS-based piezoresistive

- cantilevers with different tactile properties. *Sensors Actuators A Phys.* **285**, 362–368 (2019).
153. Ziółkowska, K., Żukowski, K., Chudy, M., ... A. D.-P. & 2011, undefined. Enhancing efficiency of double casting prototyping by thermal aging of poly (dimethylsiloxane). *Res. Ziółkowska, K Żukowski, M Chudy, A Dybko, Z BrzózkaProc, MicroTAS, 2011•researchgate.net* (2011).
  154. Aoun, L. *et al.* Measure and characterization of the forces exerted by growing multicellular spheroids using microdevice arrays. *PLoS One* **14**, e0217227 (2019).
  155. Surcel, A. *et al.* Harnessing the adaptive potential of mechanoresponsive proteins to overwhelm pancreatic cancer dissemination and invasion. *bioRxiv* 190553 (2017) doi:10.1101/190553.
  156. Estabrook, I. D., Thiam, H. R., Piel, M. & Hawkins, R. J. Calculation of the force field required for nucleus deformation during cell migration through constrictions. *PLOS Comput. Biol.* **17**, e1008592 (2021).
  157. Fung, Y. C. What are the residual stresses doing in our blood vessels? *Ann. Biomed. Eng.* **19**, 237–249 (1991).
  158. Stylianopoulos, T. *et al.* Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 15101–15108 (2012).
  159. Liu, S. Q. & Fung, Y. C. Zero-Stress States of Arteries. *J. Biomech. Eng.* **110**, 82–84 (1988).
  160. Omens, J. H. & Fung, Y. C. Residual strain in rat left ventricle. *Circ. Res.* **66**, 37–45 (1990).
  161. Xu, G., Bayly, P. V. & Taber, L. A. Residual stress in the adult mouse brain. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **8**, 253–262 (2009).
  162. Chuong, C. J. & Fung, Y. C. Residual Stress in Arteries. *Front. Biomech.* 117–129 (1986) doi:10.1007/978-1-4612-4866-8\_9.
  163. Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (80-. ).* **307**, 58–62 (2005).
  164. Santini, M. T. & Rainaldi, G. Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. *Pathobiology* **67**, 148–157 (1999).
  165. Guillaume, L. *et al.* Characterization of the physical properties of tumor-derived spheroids reveals critical insights for pre-clinical studies. *Sci. Reports 2019 91* **9**, 1–9 (2019).
  166. Fischer-Friedrich, E., Hyman, A. A., Jülicher, F., Müller, D. J. & Helenius, J. Quantification of surface tension and internal pressure generated by single mitotic cells. *Sci. Reports 2014 41* **4**, 1–8 (2014).
  167. Chanet, S., Sharan, R., Khan, Z. & Martin, A. C. Myosin 2-Induced Mitotic Rounding Enables Columnar Epithelial Cells to Interpret Cortical

- Spindle Positioning Cues. *Curr. Biol.* **27**, 3350-3358.e3 (2017).
168. Lancaster, O. M. *et al.* Mitotic Rounding Alters Cell Geometry to Ensure Efficient Bipolar Spindle Formation. *Dev. Cell* **25**, 270–283 (2013).
  169. Rolver, M. G., Elingaard-Larsen, L. O. & Pedersen, S. F. Assessing cell viability and death in 3d spheroid cultures of cancer cells. *J. Vis. Exp.* **2019**, (2019).
  170. Steinberg, M. S. Reconstruction of tissues by dissociated cells. *Sci. Sci.* **141**, 401–408 (1963).
  171. Guevorkian, K., Colbert, M. J., Durth, M., Dufour, S. & Brochard-Wyart, F. Aspiration of biological viscoelastic drops. *Phys. Rev. Lett.* **104**, 218101 (2010).
  172. Kosheleva, N. V. *et al.* Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model. *Sci. Reports 2020 101* **10**, 1–15 (2020).
  173. Hamilton, G. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett.* **131**, 29–34 (1998).
  174. Giverso, C. & Preziosi, L. Influence of the mechanical properties of the necrotic core on the growth and remodelling of tumour spheroids. *Int. J. Non. Linear. Mech.* **108**, 20–32 (2019).
  175. Delarue, M. *et al.* mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding. *Cell* **174**, 338-349.e20 (2018).
  176. Solovjeva, L. V., Demin, S. J., Pleskach, N. M., Kuznetsova, M. O. & Svetlova, M. P. Characterization of telomeric repeats in metaphase chromosomes and interphase nuclei of Syrian Hamster Fibroblasts. *Mol. Cytogenet.* **5**, (2012).
  177. Aoun, L. *et al.* Microdevice arrays of high aspect ratio poly(dimethylsiloxane) pillars for the investigation of multicellular tumour spheroid mechanical properties. *Lab Chip* **14**, 2344–2353 (2014).
  178. Meriem, Z. Ben *et al.* An easy-to-use microfluidic mechano-chemostat for tissues and organisms reveals that confined growth is accompanied with increased macromolecular crowding. *bioRxiv* 2023.03.29.534752 (2023) doi:10.1101/2023.03.29.534752.
  179. Rizzuti, I. *et al.* Mechanical-control of cell proliferation increases resistance to chemotherapeutic agents. *bioRxiv* 2020.01.18.910554 (2020) doi:10.1101/2020.01.18.910554.
  180. Cheng, G., Tse, J., Jain, R. K. & Munn, L. L. Micro-Environmental Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells. *PLoS One* **4**, e4632 (2009).
  181. Nam, S. *et al.* Cell cycle progression in confining microenvironments is regulated by a growth-responsive TRPV4-PI3K/Akt-p27Kip1 signaling

- axis. *Sci. Adv.* **5**, (2019).
182. Dolega, M. E. *et al.* Extra-cellular matrix in multicellular aggregates acts as a pressure sensor controlling cell proliferation and motility. *Elife* **10**, (2021).
  183. Singh, P. K., Doley, J., Ravi Kumar, G., Sahoo, A. P. & Tiwari, A. K. Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. *Indian J. Med. Res.* **136**, 571 (2012).
  184. Lemos de Matos, A., Franco, L. S. & McFadden, G. Oncolytic Viruses and the Immune System: The Dynamic Duo. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **17**, 349–358 (2020).
  185. Discher, D. E., Janmey, P. & Wang, Y. L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (80-. )*. **310**, 1139–1143 (2005).
  186. GEORGES, P. C., LEVENTAL, I., ROJAS, W. D. Jes., MILLER, R. T. & JANMEY, P. A. EFFECT OF SUBSTRATE STIFFNESS ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF CELLS. <https://doi.org/10.1142/S1793048006000331> **01**, 401–410 (2011).
  187. Irwin, C. R., Favis, N. A., Agopsowicz, K. C., Hitt, M. M. & Evans, D. H. Myxoma Virus Oncolytic Efficiency Can Be Enhanced Through Chemical or Genetic Disruption of the Actin Cytoskeleton. *PLoS One* **8**, e84134 (2013).
  188. Irwin, C. R. & Evans, D. H. Modulation of the Myxoma Virus Plaque Phenotype by Vaccinia Virus Protein F11. *J. Virol.* **86**, 7167–7179 (2012).
  189. Marangon, I. *et al.* Tumor Stiffening, a Key Determinant of Tumor Progression, is Reversed by Nanomaterial-Induced Photothermal Therapy. *Theranostics* **7**, 329 (2017).
  190. Levental, K. R. *et al.* Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* **139**, 891–906 (2009).
  191. Miller, B. W. *et al.* Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1063–1076 (2015).
  192. Popovic, A. & Tartare-Deckert, S. Role of extracellular matrix architecture and signaling in melanoma therapeutic resistance. *Front. Oncol.* **12**, 924553 (2022).
  193. Russell, R. J. & Robbins, S. J. Cloning and molecular characterization of the myxoma virus genome. *Virology* **170**, 147–159 (1989).
  194. Rana, P. S., Kurokawa, M. & Model, M. A. Evidence for macromolecular crowding as a direct apoptotic stimulus. *J. Cell Sci.* **133**, (2020).
  195. Edlich, F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.* **500**, 26–34 (2018).
196. Kerr, P. J. *et al.* Myxoma Virus and the Leporipoxviruses: An Evolutionary Paradigm. *Viruses* **2015**, Vol. 7, Pages 1020-1061 **7**, 1020–1061 (2015).
  197. Rahman, M. M. & McFadden, G. Oncolytic Virotherapy with Myxoma Virus. *J. Clin. Med.* **9**, (2020).
  198. Rahman, M. M. & McFadden, G. Myxoma Virus-Encoded Host Range Protein M029: A Multifunctional Antagonist Targeting Multiple Host Antiviral and Innate Immune Pathways. *Vaccines* **2020**, Vol. 8, Page 244 **8**, 244 (2020).
  199. Quillien, L. *et al.* A Novel Imaging Approach for Single-Cell Real-Time Analysis of Oncolytic Virus Replication and Efficacy in Cancer Cells. <https://home.liebertpub.com/hum> **32**, 166–177 (2021).
  200. Germier, T., Sylvain, A., Silvia, K., David, L. & Kerstin, B. Real-time imaging of specific genomic loci in eukaryotic cells using the ANCHOR DNA labelling system. *Methods* **142**, 16–23 (2018).
  201. Lun, X. *et al.* Myxoma Virus Is a Novel Oncolytic Virus with Significant Antitumor Activity against Experimental Human Gliomas. *Cancer Res.* **65**, 9982–9990 (2005).
  202. Nascimento, R., Costa, H. & Parkhouse, R. M. E. Virus manipulation of cell cycle. *Protoplasma* **249**, 519–528 (2012).
  203. Bagga, S. & Bouchard, M. J. Cell cycle regulation during viral infection. *Methods Mol. Biol.* **1170**, 165–227 (2014).
  204. Johnston, J. B. *et al.* Myxoma Virus M-T5 Protects Infected Cells from the Stress of Cell Cycle Arrest through Its Interaction with Host Cell Cullin-1. *J. Virol.* **79**, 10750–10763 (2005).
  205. Laurent-Crawford, A. G. *et al.* The cytopathic effect of hiv is associated with apoptosis. *Virology* **185**, 829–839 (1991).
  206. Pereira, H. G. The Cytopathic Effect of Animal Viruses. *Adv. Virus Res.* **8**, 245–285 (1962).
  207. MacNeill, A. L., Moldenhauer, T., Doty, R. & Mann, T. Myxoma virus induces apoptosis in cultured feline carcinoma cells. *Res. Vet. Sci.* **93**, 1036–1038 (2012).
  208. Ploubidou, A. & Way, M. Viral transport and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 97–105 (2001).
  209. Chen, H. Y., Di Mascio, M., Perelson, A. S., Ho, D. D. & Zhang, L. Determination of virus burst size in vivo using a single-cycle SIV in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19079–19084 (2007).
  210. Monnier, S. *et al.* Effect of an osmotic stress on multicellular aggregates.

*Elsevier.*

211. Foty, R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J. Vis. Exp.* e2720 (2011) doi:10.3791/2720.