



HAL
open science

Confinement spatial et prolifération de cellules sous pression

Morgan Delarue

► **To cite this version:**

Morgan Delarue. Confinement spatial et prolifération de cellules sous pression. Biotechnologies. Université toulouse 3 Paul Sabatier, 2022. tel-04879407

HAL Id: tel-04879407

<https://laas.hal.science/tel-04879407v1>

Submitted on 10 Jan 2025

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.

Confinement spatial et prolifération de cellules sous pression

Habilitation à diriger la recherche

Morgan Delarue

CRCN au LAAS-CNRS

PREAMBULE

Physicien de formation, je me suis ouvert à la biophysique en M2 avant de faire une thèse sur la physique du cancer, où j'ai réellement découvert la richesse du travail à l'interface entre la biologie et de nombreux autres domaines, notamment la physique, l'ingénierie et la médecine. J'ai particulièrement apprécié le travail de quantification de phénomènes biologiques, et j'ai développé l'envie de comprendre certains mécanismes fondamentaux, comme la prolifération, par des approches multidisciplinaires. C'est dans cet état d'esprit que j'ai effectué mes deux post-doctorats durant lesquels je me suis ouvert à la microfabrication, à l'étude de nouveaux organismes comme les microbes, mais également à la biochimie.

J'ai été recruté comme chargé de recherche au CNRS fin 2017 au sein de l'équipe MILE au LAAS-CNRS, et y mène depuis des recherches à l'interface entre la physique, l'ingénierie, la biologie, et la médecine. Mon objectif est de comprendre comment les contraintes mécaniques compressives peuvent impacter le vivant, en essayant de découvrir notamment des signatures qui pourraient être communes à divers organismes et servir de bases à de meilleures prises en compte thérapeutiques.

Selon moi, le travail interdisciplinaire tout comme le travail de recherche en général, est un travail en équipe et entre équipes. Ainsi, même si ce texte est en parti écrit à la première personne, ce « je » ne peut en réalité qu'être un « nous » qui englobe les remarquables et inspirantes personnes avec qui j'ai la chance de travailler, que ce soient les étudiant.e.s de l'équipe ou les chercheurs.euses avec qui je collabore, ici et ailleurs. Cette recherche ne pourrait se mener sans elles, et je les en remercie infiniment.

SOMMAIRE

Préambule	2
I. Introduction	5
Confinement cellulaire et pression de croissance	6
La prolifération cellulaire diminue sous confinement.....	7
Questions en suspens.....	7
Démarche interdisciplinaire.....	8
II. Développement d'outils microfluidiques pour confiner spatialement	9
Étude de l'effet du confinement spatial et de la pression de croissance	10
Puce microfluidique pour confiner dynamiquement une population de levures	10
Adaptation de cet outil pour le confinement de bactéries	12
Développement de « tiges » et confinement spatial de cellules mammifères	12
Dynamique similaire de la pression de croissance développée par les organismes	13
Autres applications des tiges : micropipettes-sur-puce.....	14
Conclusions et Perspectives.....	14
III. Encombrement macromoléculaire et pression de croissance	16
L'encombrement macromoléculaire : propriété biophysique par les tous les organismes.....	17
Suivi de particule unique pour mesurer l'encombrement macromoléculaire	18
Diffusion de particules dans les cellules : étude des caractéristiques rhéologiques	19
Diffusion similaire des GEMs chez plusieurs organismes.....	20
Impact de la croissance confinée sur l'encombrement macromoléculaire	21
Augmentation de l'encombrement macromoléculaire nucléaire sous pression.....	22
Conclusions et Perspectives.....	22
IV. Impact de la pression de croissance sur la prolifération	24
Réduction de la croissance sous confinement de <i>S. cerevisiae</i>	25
Réduction de la biosynthèse sous pression de croissance.....	25
La biosynthèse semble limitée par l'augmentation de l'encombrement	26
Modèle prédictif de la réduction de croissance sous confinement.....	27
Réduction de la division cellulaire sous confinement.....	28
Coordination entre croissance et division sous pression	29
Conclusions et Perspectives.....	29
V. Pression de croissance et pathogénicité : cas de la candidose et du cancer	31
La pression de croissance déclenche la transition levure-hyphes chez <i>C. albicans</i>	32
L'activation de la transition levure – hyphes est transitoire sous confinement.....	33
La croissance, la biosynthèse et la division sont également inhibés chez <i>C. albicans</i>	33
La réduction de prolifération sous pression limite l'efficacité d'agents thérapeutiques	34
Vers des applications de traitement et de diagnostic dans le cancer	35
Conclusions et Perspectives.....	36

VI. Conclusions générales	38
VII. Littérature citée.....	39
VIII. Annexes	45
Curriculum vitae	46
Expérience de recherche	46
Education.....	46
Bourses et prix.....	46
Communications scientifiques.....	46
Publications scientifiques.....	47
Enseignement, formation, diffusion de la culture scientifique	49
Thèses, post-doctorats et stages encadrés	49
Enseignement.....	50
Organisation de conférences	50
Travaux d'expertise et jury de thèse	50
Contrats de recherche.....	51
Projets en cours.....	51
Projets passés	51
Animation et responsabilités institutionnelles	51
Abstract.....	53

I. INTRODUCTION

Confinement cellulaire et pression de croissance

La prolifération cellulaire est un processus coordonné de croissance (augmentation irréversible de volume et de masse cellulaire) et de division (duplication et séparation du matériel génétique et des constituants de la cellule en deux nouvelles cellules). La coordination de ces deux processus est essentielle à la maintenance, à l'échelle de la population, du volume moyen de la cellule. Cette coordination a fait l'objet de nombreuses études cette dernière décennie¹⁻⁷.

La prolifération cellulaire est à la base de la création d'assemblées multicellulaires, retrouvées partout dans le vivant : les organes et tissus biologiques, les plantes ou encore les biofilms microbiens sont autant d'exemples d'assemblées multicellulaires (Figure 1). Un point

crucial, souvent négligé dans leur étude, est le fait qu'elles évoluent pour la plupart dans un espace physiquement limité : nous parlons alors de croissance confinée, à opposer par exemple à la croissance planctonique. Des exemples de cette croissance confinée existent dans toutes les strates du vivant. Les racines des plantes poussent notamment sous terre, et doivent déplacer leur environnement pour progresser, développant des forces telles qu'elles peuvent fragiliser voire déformer du béton. Lors du développement d'organismes animaux, les tissus ont des frontières physiques qui ne peuvent s'étendre indéfiniment, amenant des organes à être entourés d'autres organes. De même, la croissance microbienne en biofilm est limitée soit par la porosité/structure du matériau dans lequel évolue ce dernier, soit par son adhésion aux surfaces. De manière générale, ce confinement peut donc être 2D si les cellules adhèrent fortement à leur substrat, 3D sinon. Nous nous intéressons plus particulièrement au confinement 3D.

Pour continuer de croître dans ces espaces confinés, les cellules doivent pousser leurs alentours pour déplacer leur environnement, qui peut être d'autres cellules, une matrice élastique, ou encore les frontières physiques elles-mêmes. A l'échelle de la population cellulaire, une contrainte compressive émerge de ces forces de croissance, que nous dénommons simplement « pression de croissance » (Figure 2). Un aspect important de la pression de croissance est qu'elle est présente partout dans le vivant, et peut être expérimentée par n'importe quel organisme ne nécessitant pas d'adhésion cellule-cellule pour émerger à 3D. Cet aspect est à mettre en regard des forces de traction / tension qui, elles, nécessitent de l'adhésion pour émerger⁸. De ce fait, la pression de croissance revêt un caractère presque universel dans le monde du vivant. Alors que les forces de tensions sont très étudiées notamment en lien avec l'impact qu'elles ont sur le cortex cellulaire (voir Refs. 9-13 pour quelques exemples fameux), les forces compressives restent peu étudiées, leur impact peu compris et leur intégration non élucidée.

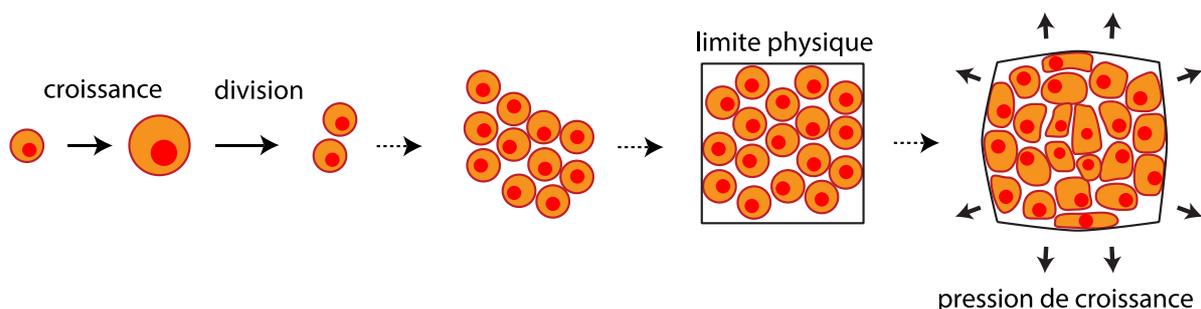
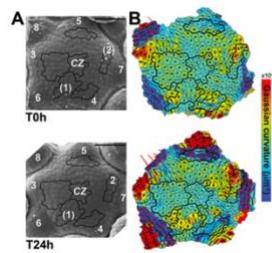
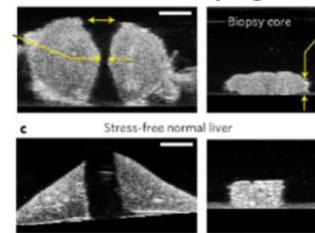


Figure 2 : la croissance et la division sont à la base de la création d'assemblées multicellulaires. Celles-ci évoluent naturellement dans un espace limité. La croissance confinée implique l'émergence d'une pression de croissance.

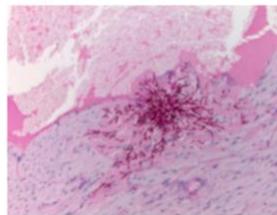
Plants: *A. thaliana* development



Mammals: tumors progression



Fungi: *C. albicans* invasion



Bacteria: *N. meningitidis* development

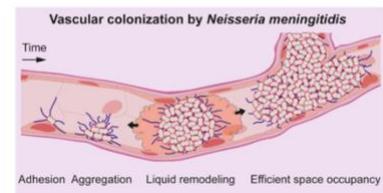


Figure 1 : Le vivant évolue sous confinement. La croissance surfacique de cellules de plantes durant le développement d'*A. thaliana*, la croissance confinée de cellules tumorale, fongiques ou bactériennes, sont autant d'exemples de confinement 2D ou 3D.

La prolifération cellulaire diminue sous confinement

Une conséquence directe et presque intuitive de la croissance confinée et de l'émergence de la pression de croissance associée est que les cellules ne peuvent pas croître et se diviser indéfiniment sans adaptation. En effet, une division continue imposerait des cellules qui deviendraient de plus en plus petites, ce qui a nécessairement une limite, une cellule ne pouvant être un point. De même, une croissance potentiellement soutenue engendrerait une pression de croissance toujours plus grande, qui sera également limitée par la fragilité du matériau ou des cellules elles-mêmes. Ainsi, croissance et division doivent diminuer lorsque les cellules sont confinées, et des mécanismes d'adaptation, qu'ils soient physiques ou biologiques, exister.

Dans cette perspective, nos résultats et ceux de nos collègues montrent que la prolifération sous ce type de contrainte diminue chez les plantes^{14,15}, chez les cellules animales¹⁶⁻¹⁸, chez les levures¹⁹⁻²¹ ou encore chez les bactéries^{22,23}. Cette décroissance, observée chez tous les organismes étudiés, semble progressive et pourrait être spécifique à l'organisme (notamment procaryote vs eucaryote), qui aurait en particulier pu développer des stratégies uniques lui permettant de contrer les limites physiques inhérentes à cette prolifération.

Un exemple fameux de la diminution de prolifération cellulaire lorsque l'espace est limité est « l'inhibition de contact »²⁴. Cette propriété, qui apparaît comme étant spécifique aux cellules animales, a été constatée par l'arrêt de la prolifération cellulaire en deux dimensions (2D) lorsque la densité de cellules est telle que les cellules entrent en contact. A ma connaissance, l'inhibition de contact n'a pas été étudiée du point de vue de la pression de croissance, qui pourrait aussi s'exercer à 2D. Cet exemple, essentiel en biologie car étant à la base de l'homéostasie de taille des tissus, montre l'importance de l'étude de la pression de croissance dans des conditions qui pourraient être qualifiées de « normales ».

A l'opposé des cellules normales, les cellules cancéreuses semblent adaptées à la croissance confinée. En effet, les tumeurs se développent dans un espace confiné mais continuent de proliférer. Dans le cas du cancer du pancréas, les modifications du microenvironnement provoquent le développement d'une matrice extracellulaire compressive, contrainte mécanique qui se superpose à la prolifération cellulaire confinée entraînant l'émergence de pression de croissance. A ces contraintes, une étude récente montre que les fibroblastes activés du stroma peuvent entourer des îlots de cellules cancéreuses et exercer des forces compressives importantes²⁵. Les tumeurs du pancréas, comme la plupart des tumeurs solides, sont très comprimées, avec une pression de l'ordre de plusieurs kilopascals²⁶⁻²⁸. Quelles altérations génétiques et quelles adaptations de leurs propriétés physico-chimiques permettent aux cellules de proliférer dans de tels environnement restent en grande partie un mystère. Quoiqu'il en soit, cette pression de croissance est associée à la fois à la progression de la maladie²⁹⁻³¹ mais aussi à des échecs thérapeutiques^{16,32}.

Le cas des tumeurs solides n'est pas le seul exemple de pathologies pour lesquelles la pression de croissance pourrait avoir un rôle. Certaines pathologies microbiennes, associées à des levures comme *C. albicans* ou à des bactéries comme *N. meningitidis*, pourraient aussi voir ce paramètre mécanique jouer un rôle dans la pathogénicité. *N. meningitidis*, par exemple, peut obstruer des capillaires sanguins dans lesquels se forment des caillots, confinant spatialement leur prolifération. Alors que la question du confinement est (même partiellement) étudiée dans le cas du cancer ou de la biologie du développement, elle est presque totalement absente des études chez les microbes.

Questions en suspens

Nous pensons que le manque d'outils à disposition des chercheurs pour étudier l'impact du confinement spatial mène à une mauvaise compréhension de nombreux mécanismes et conséquences de ces contraintes. Cette mécompréhension soulève de nombreuses questions qui restent en suspens, et guident nos projets de recherche :

- Quels mécanismes sont mis en jeu lors de la réduction de prolifération ? Est-ce que ces mécanismes ont une origine physique et / ou une origine biologique ? Est-ce que ces mécanismes sont adaptatifs ou régulés ?
- Est-ce que les mécanismes réduisant la prolifération sont similaires pour différents organismes ? Y a-t-il une réponse évolutive conservée qui expliquerait cette convergence phénotypique ?
- De manière générale, quelles sont les conséquences de la pression mécanique sur les organismes ? Nous savons qu'elle réduit la prolifération, cela a-t-il un impact sur la physiologie cellulaire ? Y a-t-il une synergie avec d'autres contraintes ? Cela influence-t-il la pathogénicité des organismes, ou l'émergence / le traitement de maladies ?
- Enfin, que peut-on apprendre de ces régulations pour mieux comprendre la prolifération cellulaire ? Peut-on utiliser ces connaissances à des fins thérapeutiques ?

Démarche interdisciplinaire

Répondre à ces questions entraîne nécessairement une approche interdisciplinaire. Ainsi, nos activités de recherche se situent à l'intersection de quatre disciplines, qui peuvent se nourrir l'une l'autre :

Ingénierie

Nous avons besoin de développer de nombreux outils pour étudier le confinement spatial. Quels matériaux utiliser, comment mesurer les forces ou en imposer, comment contrôler les conditions physico-chimiques tout en étant capable de sonder la réponse cellulaire, sont autant de questions qui nécessitent des développements spécifiquement adaptés à chaque organisme. Une approche d'ingénieur est donc essentielle pour construire les briques élémentaires permettant d'étudier l'impact du confinement spatial.

Physique

La physique de la cellule commence à être assez comprise, notamment en ce qui concerne ses propriétés de surface. Néanmoins, nous ne savons pas comment la pression de croissance se développe, ni comment elle impacte la physique de la cellule par-delà sa membrane. De plus, à l'échelle de la population de cellules, la manière dont les contraintes compressives influencent la perméabilité est inconnue. De manière générale, une approche de physicien permettant le développement de modèles théoriques prédictifs permettra de comprendre certains de ces phénomènes, et d'en extraire les caractéristiques essentielles.

Biologie

Ce projet est bien sûr intrinsèquement à l'interface avec la biologie. Nous avons besoin d'outils pour comprendre comment la physique affecte la biologie de la cellule, pour mesurer certaines réponses de signalisation spécifiques, ou encore pour étudier l'universalité de la réponse. Nous collaborons ainsi avec de nombreux biologistes apportant une expertise spécifique à l'organisme (cellules mammifères, fongique ou bactérienne) mais étant également spécialisé.e.s dans certaines réponses biologiques telles que la division cellulaire ou la signalisation.

Médecine

Nos études fondamentales trouvent une place toute particulière dans les applications médicales qu'elles pourraient apporter. Nous avons dans un premier temps besoin de mesures *in vivo* afin de connaître l'intensité des contraintes développées dans le cas notamment d'une tumeur. Nous comptons également pouvoir utiliser les résultats que nous obtenons pour proposer de nouvelles pistes thérapeutiques ou de diagnostic / pronostic dans certaines maladies comme le cancer.

Il me semble qu'aucune question à ce point interdisciplinaire ne peut être étudiée sans le concours de différentes expertises. Ma démarche est alors celle d'un physicien fasciné par les questions biologiques et médicales et par les développements technologiques nécessaires pour y répondre. Nous collaborons avec de nombreuses équipes, et tâchons de mener des études les plus interdisciplinaires possibles, afin d'explorer les multiples facettes de ces questions fondamentales.

Ce manuscrit comprend quatre grands chapitres, qui ont chacun une coloration plus axée sur l'une ou l'autre des disciplines susnommées. Bien sûr, aucune partie n'est entièrement mono-disciplinaire, mais peut s'appréhender relativement indépendamment des autres. Les personnes encadrées ayant participé aux travaux dans ces différentes parties sont citées sur la page de garde du chapitre en question.

Nous présenterons dans un premier temps notre [approche ingénierie](#) et les différents développements technologiques mis en œuvre pour confiner différents organismes et pouvoir étudier l'impact de la pression de croissance.

Puis, nous présenterons une approche de l'étude des [modifications physiques](#) de la cellule engendrés par la pression de croissance, en insistant plus particulièrement sur une propriété clef : l'encombrement macromoléculaire.

Nous plongerons ensuite dans [l'univers biologique de la cellule](#), et présenterons nos premières conclusions concernant la régulation de la croissance et de la division de *S. cerevisiae* sous confinement spatial, ainsi que ce que nous en déduisons pour les autres organismes.

Enfin, nous explorerons différentes questions liées à la [pathogénicité](#), en présentant un récent projet sur l'impact du confinement sur le pathogène *C. albicans*, et des conclusions sur l'effet de la pression mécanique sur le traitement de cellules cancéreuses.

II. DEVELOPPEMENT D'OUTILS MICROFLUIDIQUES POUR CONFINER SPATIALEMENT

Encadrement sur cette partie :

- Post-doctorants : Zacchari Ben Mériem, Gabriel Lemerrier
- Etudiant.e.s en thèse : Baptiste Alric, Lucie Albert, Tiphaine Matéo, Laure Le Blanc, Térance Desclaux

Nous allons détailler dans ce chapitre les différentes méthodes développées au cours de ces dernières années pour confiner spatialement une population de cellules. Nous sommes de plus en plus convaincus que la microfluidique offre la versatilité nécessaire à ce genre d'étude, permettant un contrôle fin et dynamique de nombreux paramètres physico-chimiques. L'une des principales raisons de nos activités au sein du LAAS-CNRS est justement de pouvoir s'appuyer sur une salle blanche très complète et polyvalente, permettant de travailler à des échelles de tailles variées allant du submicrométrique à la centaine de micromètres, et d'être entourés d'experts en microfabrication, apportant des conseils et un savoir-faire indispensables.

Étude de l'effet du confinement spatial et de la pression de croissance

Comme présenté dans l'introduction, les cellules évoluent dans des environnements confinés, et expérimentent des contraintes compressives inhérentes aux limites physiques de leur espace. L'étude de ces contraintes est complexe, car elle nécessite de développer des outils permettant un confinement spatial, tout en assurant une bonne alimentation des cellules.

Une stratégie mise en place pour les cellules mammifères consiste en l'inclusion soit de cellules uniques^{18,33} soit de sphéroïdes déjà formés¹⁶ dans des hydrogels, notamment d'agarose, mais aussi, par exemple, de poly-acrylamide³⁴ ou d'alginate³⁵. Les cellules prolifèrent localement dans cette inclusion et développent une pression de croissance. Cette dernière est mesurée par le volume de l'assemblée de cellules, et nécessite pour cela une bonne connaissance des propriétés mécaniques de l'hydrogel utilisé. Cela étant dit, ces hydrogels sont naturellement poreux avec des pores de plusieurs dizaines de nm³⁶, plus gros que la plupart des facteurs de croissance, permettant une bonne alimentation par diffusion autour de l'assemblée multicellulaire. Les modules élastiques de ces gels, de l'ordre du kPa, permettent quant à eux des mesures de pression de l'ordre du kPa, compatibles avec les pressions de croissance des cellules mammifères.

Cette méthode a cependant certaines limites :

- Pour la méthode partant de cellules uniques¹⁸, toutes les cellules n'arrivent pas à développer directement de la pression. Ceci limite le nombre de réplicats et rend le suivi assez compliqué, ne sachant pas quelles cellules imager dès le début.
- Pour la méthode de confinement partant de sphéroïdes, un problème est que ceux-ci peuvent être assez gros initialement (dépassant les 200µm), créant ainsi une structuration de l'assemblée multicellulaire et des gradients chimiques. La réponse mécanique étant déjà peu connue, comment la contrainte mécanique se couple à des gradients chimiques, bien qu'intéressante, l'est encore moins.
- Les mesures de pression sont assez complexes, les propriétés des hydrogels n'étant pas toujours simplement élastiques. De plus, les hydrogels peuvent rompre après une certaine déformation, relaxant localement la contrainte³³.
- Tous les hydrogels ne se prêtent pas facilement à une relaxation de la contrainte. Ceci limite en particulier la récupération de l'échantillon biologique pour de plus amples analyses. Même si dans certains cas la digestion du gel est possible, les modifications dynamiques ne le sont pas, ce qui limite le type d'expérimentations possibles.
- Les assemblées multicellulaires issues de ces inclusions ne peuvent pas facilement être imagées à haute résolution, limitant le type d'analyse que nous pouvons faire – en particulier, il devient très compliqué de réaliser des mesures de microrhéologie intracellulaire par suivi de particule³⁷.
- Enfin, cette méthode n'est pas adaptée à tous les organismes, notamment ceux qui développent une pression de croissance importante. Bien qu'une étude récente utilise une inclusion en agarose pour étudier l'effet du confinement sur l'organisation de *V. cholera*³⁸, ce gel est limitant pour de fortes pressions, développées notamment par des organismes comme les levures ou les cellules végétales.

Ces dernières années, nous nous sommes attachés à développer de nombreuses solutions qui permettraient de circonvenir autant que possible aux points soulevés ci-dessus. La plupart des solutions sont adaptées d'une puce microfluidique développée durant mes années de post-doctorat à l'Université de Berkeley, qui nous a permis d'étudier l'effet du confinement sur la levure du boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*.

Puce microfluidique pour confiner dynamiquement une population de levures

La puce que nous avons développée avait pour cahier des charges de pouvoir facilement confiner une population de la levure du boulanger *Saccharomyces cerevisiae*, tout en assurant son alimentation, une imagerie optimale, et la possibilité de contrôler le confinement / la pression mécanique afin d'étudier la relaxation et la dynamique de la réponse.

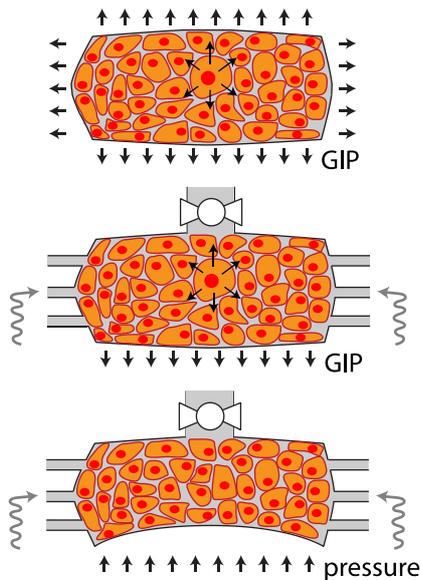


Figure 3 : Schémas explicatifs du dispositif microfluidique.

Après plusieurs itérations, nous avons convergé vers un système très versatile, qui a fait l'objet d'un chapitre dans un ouvrage de méthodes pour la biologie cellulaire³⁹. La Figure 3 ci-contre schématise ce dispositif. Il consiste en une cage formée d'un élastomère, le polydiméthylsiloxane (PDMS) dans laquelle nous pouvons charger une population de cellules. Cette cage est connectée, sur les côtés, à de fins canaux permettant d'alimenter les cellules, mais qui sont trop petits pour que les cellules puissent s'échapper de la chambre. La chambre de culture est connectée à un canal qui permet de charger les cellules, et qui peut être fermé par une valve. Nous avons développé plusieurs types de valves, qui permettent par exemple de dynamiquement ouvrir / fermer la chambre, ou encore de la fermer totalement, sans relaxation possible. Ces chambres ont été parallélisées de manière à avoir de nombreux réplicas techniques sur chaque puce.

Les cellules sont confinées dans cette chambre de culture. Leur prolifération génère une pression de croissance que nous mesurons par la déformation du PDMS. L'élasticité de ce matériau est linéaire sur une assez grande gamme de déformation, et peut facilement être calibrée à l'aide de contrôleurs de pression. Le dispositif destiné à l'utilisation des levures permet ainsi de mesurer une pression de croissance avec une précision de l'ordre de 10kPa.

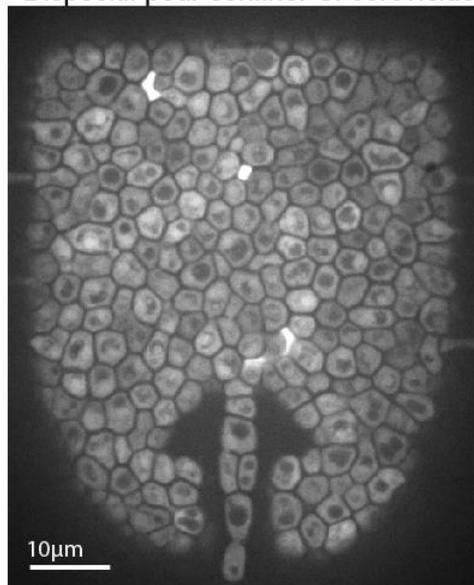
La valve permettant le confinement de la population peut être ouverte ou fermée dynamiquement. Ceci permet notamment une diminution du nombre de cellules dans la chambre, et une modulation de la pression mécanique avec une possible relaxation à zéro. De plus, dans certains modèles, nous avons connecté un des murs de la chambre à une membrane déformable, ce qui permet de dynamiquement et quasiment instantanément comprimer une population de cellules.

Enfin, nous pouvons coller cette puce sur une lamelle de verre (#1), ce qui permet une imagerie optimale et à haute résolution (nous avons déjà utilisé ce dispositif avec des techniques d'imagerie telles que le FRAP, microscopie confocal / spinning disk, FLIM ou encore FCS).

La Figure 4, gauche, montre une image de levures confinées dans un des dispositifs que nous avons développés. L'image a été réalisée avec un microscope confocal au 63x, et nous permet d'apprécier une population de *S. cerevisiae* exprimant une GFP cytoplasmique ayant développé une pression de croissance de l'ordre de 500kPa. Nous pouvons voir notamment que les cellules adoptent une forme très polygonale, à l'opposé de la forme typique « en ballon de rugby » que ces cellules ont normalement.

Nous avons développé de nombreuses versions de ce dispositif pour la culture de levures, et les utilisons en routine pour de nombreuses études^{19,20,40}. Ces dispositifs sont à un degré de maturité et de robustesse tel que nous pouvons les partager facilement avec des laboratoires ne faisant pas de microfluidique : plusieurs collaborations sont ainsi en cours grâce à cette technologie, et permettent d'explorer des aspects connexes à nos intérêts.

Dispositif pour confiner *S. cerevisiae*



Dispositif pour confiner *E. coli*



Figure 4 : Dispositif pour confiner une population de levure *S. cerevisiae*. Ce dispositif peut être miniaturisé pour être adapté au confinement d'une population de la bactérie *E. coli*. Crédits : B. Alric et L. Le Blanc.

Adaptation de cet outil pour le confinement de bactéries

Le dispositif présenté ci-dessus a été adapté à une population de bactéries. Nous avons choisi comme objet d'étude la bactérie *E. coli*, qui est un bâtonnet de quelques micromètres de long et de 500nm de diamètre. Le point critique dans nos dispositifs est toujours l'alimentation : il faut que les canaux existent pour alimenter les cellules en milieu de culture, mais il ne faut pas que les cellules puissent passer à travers. Ainsi, pour l'étude de bactéries, ces canaux ont été redimensionnés à des dimensions submicrométriques.

Nous avons développé deux stratégies nous permettant d'augmenter la résolution de ces canaux pour l'alimentation de bactéries. Dans un premier temps, nous avons réalisé une lithographie électronique, suivie d'une gravure pour ressortir les canaux, et d'une photolithographie « classique » pour construire les chambres. Cette méthode fonctionne parfaitement, mais a le désavantage d'être assez lente et onéreuse. Dans un second temps, nous avons utilisé une lithographie par Stepper⁴¹. Ce système permet de contourner la résolution des masques utilisés dans des aligneurs en projetant directement le motif avec un facteur de réduction de 5 : un motif de 1µm nécessite un masque fabriqué avec ce même motif à 5µm. Grâce à ce système, nous pouvons nous rapprocher de la limite de diffraction, et avons pu réaliser des canaux de 300nm x 300nm. Le stepper permet également de reproduire rapidement et un grand nombre de fois le même motif sur la galette de silicium.

Dans les deux cas, nous avons réussi à adapter notre puce développée pour les levures aux bactéries assez petites. La mesure de la pression est un peu moins précise (entre 20 et 30kPa), la déformation étant plus faible, mais reste tout de même réalisable. La partie droite de la Figure 4 montre ainsi une population de la bactérie *E. coli* confinée, et ayant développé une pression de croissance de l'ordre de 100kPa. Comme pour les levures, nous pouvons apprécier la large déformation de ces bactéries.

Ce dispositif nous ouvre beaucoup de perspectives concernant l'étude de la compression sur les procaryotes, et comment ces cellules y répondent, en comparaison notamment aux eucaryotes.

Développement de « tigarettes » et confinement spatial de cellules mammifères

Nous avons cherché à adapter par une simple mise à l'échelle les dispositifs précédents à l'étude des cellules mammifères. Au-delà de l'adhésion cellule-cellule plus prononcée de ces dernières, une autre différence est qu'elles ne possèdent pas de mur cellulaire, les rendant plus déformables que des levures ou des bactéries. Or, cette faible déformation nous permet justement de confiner des cellules possédant un mur, nous appuyant sur leur capacité à effectuer des transitions de blocage¹⁹. Une autre difficulté réside dans le fait que la pression développée est bien plus faible (de l'ordre de 1-10kPa), ce qui rend impossible la mesure de la pression par la déformation du PDMS directement comme nous le faisons.

Nous avons développé une méthodologie, basée sur les « murs glissants » publiés par Venzac et al.⁴², qui nous permet d'efficacement former des cages réversibles en microfluidique. L'idée est d'utiliser un élément exogène, structuré, qui nous permette de fermer une cage dans laquelle serait cultivée une assemblée de cellules mammifères. Cet élément consiste en une petite tige que nous appelons « tigarette », qui est centimétrique dans la longueur et mesure 500µm de large et de hauteur. Nous les fabriquons par lamination et structuration successive d'une résine sèche. Après développement, cette méthode nous permet de récupérer un très grand nombre de ces structures (Figure 5).

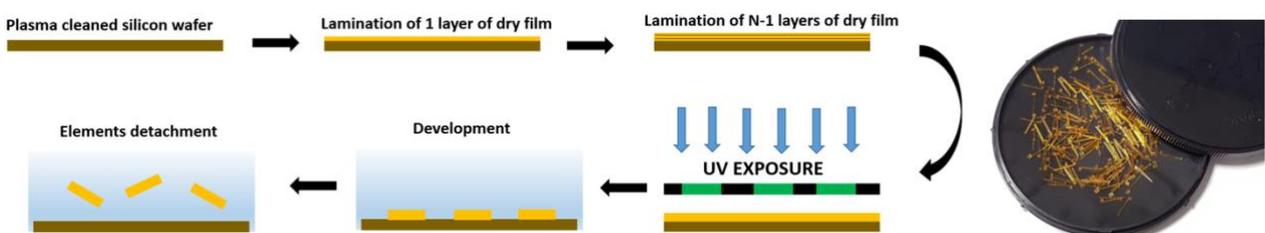


Figure 5 : Processus de fabrication des « tigarettes », par lamination et structuration par photolithographie d'une résine sèche. Après développement, nous récupérerons des centaines de tigarettes. Crédit : Z. Ben Mériem

Ces tigarettes sont insérées dans des puces en PDMS (Figure 6a). Ces puces contiennent des chambres, connectées à de fins canaux. Grâce à la tigarette, nous pouvons charger des sphéroïdes multicellulaires de 100µm de diamètre (afin d'éviter d'éventuels gradients chimiques), et fermer les chambres afin d'induire un confinement. Les sphéroïdes prolifèrent dans ces chambres, et développent une pression de croissance, que nous pouvons mesurer grâce à un capteur de pression sensible à 0.1kPa. Ce capteur consiste en une membrane attachée uniquement en haut, comme un « clapet », et qui se déforme très fortement pour de faibles pressions.

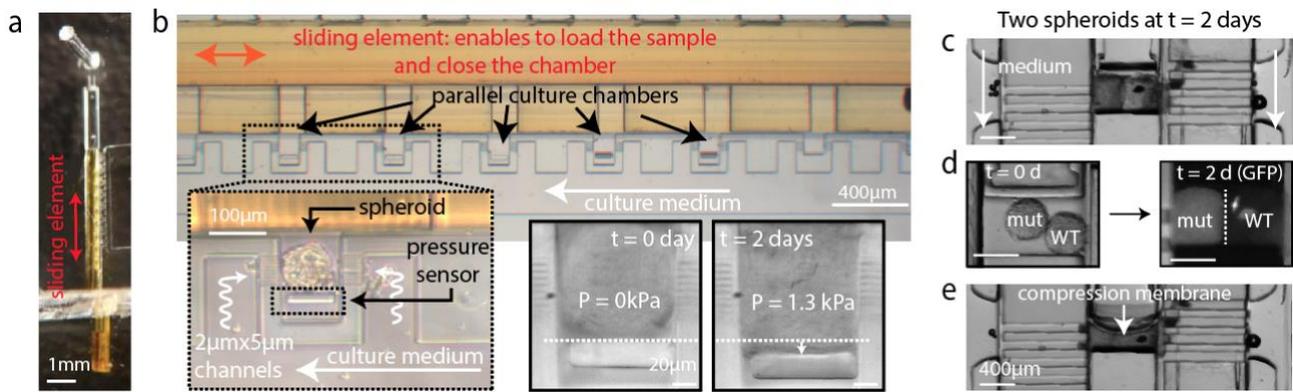


Figure 6: Dispositifs pour comprimer des assemblées de cellules mammifères. a. « Tigette » (que nous dénommons « sliding element » en anglais), qui peut s'insérer et glisser dans une puce en PDMS. b. Dispositif moyen débit de confinement de sphéroïdes. Ceux-ci peuvent être chargés dans la puce par la tigette, qui ensuite ferme la chambre pour les confiner. La chambre peut être rouverte pour récupérer l'échantillon. La chambre est connectée à de minces canaux qui permettent une bonne alimentation des cellules, ainsi qu'à une membrane déformable (sous forme de clapet) pour une mesure de la pression de croissance. c-e. Nous avons développé des dispositifs permettant d'enfermer deux sphéroïdes, pour réaliser, par exemple, des expériences de compétition. Une membrane permet de les comprimer instantanément. Crédits : T. Matéo et Z. Ben-Mériem.

Nous remarquons qu'au bout de quelques jours, une pression de croissance de l'ordre du kPa est développée (Figure 6b). Ce dispositif garde l'essence de ce que nous avons présenté plus haut (Figure 3), mais est totalement adapté aux agrégats multicellulaires. Notons cependant que, pour l'instant, ce dispositif ne permet pas de confiner les cellules sur des temps très longs : en effet, les cellules passent sous le clapet nous permettant de mesurer la pression de croissance lorsque celui-ci est trop déformé. Nous travaillons à de nouvelles versions de ce capteur de pression.

Nous avons développé maintenant plusieurs versions de ce dispositif, comme celui présenté en Figure 6c-e, qui consiste en une version où deux sphéroïdes sont enfermés dans une cage, ce qui nous permet par exemple d'effectuer des expériences de compétition, comme théorisées dans⁴³. De plus, une membrane déformable nous permet, comme plus haut, de comprimer instantanément des sphéroïdes.

Il faut noter qu'à l'inverse des dispositifs microfluidiques présentés pour les levures ou les cellules, nous pouvons ici récupérer les échantillons pour effectuer d'autres analyses *ex situ* (IF, western blot, transcriptomique, etc.), et ceci grâce à cette technologie de tiges. Très versatiles, elles peuvent être structurées à façon, et permettre de réaliser des « cages » microfluidiques stables. Nous avons montré que nous pouvions par exemple utiliser ces cages pour étudier le nématode *C. elegans* (collaboration C. Guynet), ou encore le développement d'une patte de drosophile (collaboration M. Suzanne).

Dynamique similaire de la pression de croissance développée par les organismes

Nous avons mesuré la pression de croissance développée par *S. cerevisiae* et *E. coli* grâce aux puces mentionnées ci-dessus. Nous avons utilisé une méthode d'inclusion en agarose, développée pour étudier l'impact de la pression de croissance sur la résistance aux agents chimiothérapeutiques¹⁶ (voir Chapitre V page 31), pour extraire une courbe de pression de croissance pour les cellules mammifères.

Nous avons renormalisé le temps pour chaque courbe par le temps caractéristique de chaque organisme – le temps de division nominal – et les pressions de croissance par les pressions caractéristiques – les pressions de turgescence (env. 1.5 kPa pour les cellules A338, 300kPa pour *S. cerevisiae* et 50 kPa pour *E. coli*). La Figure 7 ci-contre montre qu'ainsi renormalisées, les courbes de pression de croissance ont une dynamique similaire, malgré la très grande distance évolutive de ces différents organismes. Ce point très intéressant, qui sera discuté dans les chapitres suivants, est à la base d'un certain nombre de nos activités de recherches.

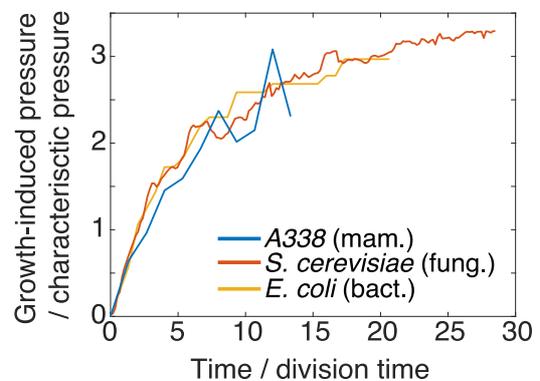


Figure 7 : Pression de croissance développée par des cellules mammifères (lignée du cancer du pancréas A338), par des levures (*S. cerevisiae*) et par des bactéries (*E. coli*). La pression est normalisée par la pression caractéristique de l'organisme, et le temps par le temps de division.

Autres applications des tiges : micropipettes-sur-puce

La capacité de structurer les tiges nous permet d'explorer d'autres géométries non facilement réalisables en microfluidique. La fabrication couche par couche, et notamment le fait de pouvoir fabriquer les tiges « sur le côté » puis de les utiliser sur une autre face que celle structurée nous permet de créer de nombreuses géométries, comme notamment des structures cylindriques traversantes (Figure 8a-b). Nous avons eu l'idée d'utiliser ces structures afin de réaliser de nouvelles versions de micropipettes-sur-puce. Les micropipettes sont classiquement utilisées pour évaluer les propriétés rhéologiques de cellules, vésicules géantes, ou encore de sphéroïdes multicellulaires. Elles consistent en des pipettes en verre étirées pour que leur diamètre interne soit compatible avec les objets étudiés ($\sim 5\mu\text{m}$ pour une cellule / vésicule, $\sim 50\mu\text{m}$ pour un sphéroïde).

L'idée, dans notre cas, était de couper un canal microfluidique avec une tige structurée d'un canal cylindrique et, par application d'une différence de pression, de bloquer un objet biologique à l'entrée du canal. Les premières études ont été réalisées par M. Elias durant sa thèse (encadrée par P. Joseph). Nous pouvons par exemple observer en Figure 8c un sphéroïde multicellulaire bloqué dans un canal cylindrique formé par une tige traversant un canal, et soumis à une différence de pression de quelques mbars. La dynamique d'aspiration de cet objet nous permet de remonter à ses propriétés rhéologiques.

Des travaux utilisant les micropipettes-sur-puce sont en cours au sein de l'équipe MILE du LAAS-CNRS, et concernent principalement les activités de P. Joseph. Cette technologie, très versatile et permettant un haut débit, nous a également permis de démarrer une collaboration avec O. Cochet-Escartin (ILM, Lyon), qui étudie entre autres le lien entre signalisation et rhéologie chez l'hydre.

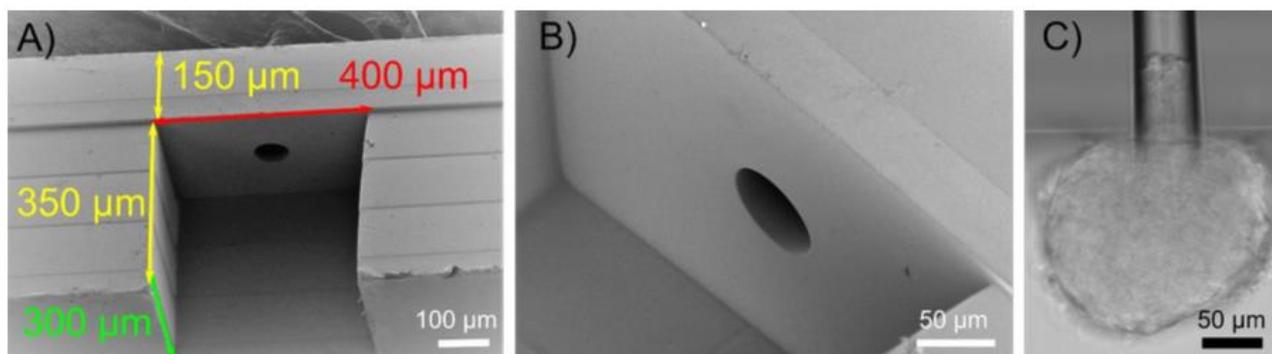


Figure 8: Micropipette-sur-puce pour l'étude de la rhéologie de sphéroïdes multicellulaires. a-b. Images en microscopie électronique à balayage des tiges avec un trou cylindrique. c. Sphéroïde aspiré dans la micropipette-sur-puce. Crédit : M. Elias.

Conclusions et Perspectives

Les développements technologiques font partie intégrante de nos projets de recherche, et permettent également de cultiver une identité propre, tout en s'appuyant sur les capacités de microfabrication de très haut niveau du LAAS-CNRS. Nous sommes maintenant en capacité de proposer des dispositifs à des échelles de taille très diverses, allant du submicrométrique à la centaine de micromètres. Ces dispositifs sont à la fois une fin et un moyen : ils permettent de proposer des solutions techniques pour l'étude d'organismes variés dans des conditions mécaniques et chimiques contrôlées, et ainsi de développer diverses collaborations basées sur cette technologie. Mais ils sont également essentiels à nos propres sujets de recherche, pour étudier la manière dont le confinement impacte la physiologie cellulaire. Ils nous ont notamment permis de montrer que la dynamique de développement de pression de croissance de divers organismes confinés semble similaire.

Parmi les développements réalisés au cours de ces dernières années, celui des tiges est peut-être le plus prometteur. Il change ainsi, d'une certaine manière, un paradigme en microfluidique : au lieu d'avoir une puce préparée spécifiquement pour une fonction donnée, nous pouvons réaliser des puces plus simples, et apporter la fonction par la tige. Prenons l'exemple de la micropipette-sur-puce : une même puce peut être utilisée pour toutes les expérimentations de rhéologie, quel que soit l'objet étudié (cellule ou sphéroïde par exemple), car l'étude de cet objet sera déportée sur la tige utilisée dans cette puce.

Nous allons ainsi continuer les développements autour des tiges, en suivant deux axes principaux :

1. Le premier consistera à développer des tiges en verre, à partir de la gravure sur verre. Nous avons déjà initié ces développements. Cela permettra de réaliser des structures 3D plus complexes, de ne plus avoir

d'autofluorescence provenant des films secs, de mieux réutiliser les tiges (possibilité d'autoclaver), mais aussi de pouvoir mieux contrôler l'état de surface.

2. Le second aura pour objectif de continuer le développement de nouvelles fonctions sur les tiges. Parmi les fonctionnalités qui nous paraissent essentielles, nous aimerions développer des « électro-tiges » : tiges possédant des électrodes. Celles-ci pourraient avoir de très nombreuses applications, comme notamment de permettre un interfaçage simple de la microfluidique avec l'électrochimie. Concernant nos projets, elles nous permettraient de mesurer l'activité métabolique (consommation d'oxygène ou autre espèce comme le glucose, acidification, etc.) des cellules sous contrainte mécanique. Nous avons déjà initié un tel projet en interne, en collaboration avec l'équipe MICA du LAAS-CNRS, et couplé des mesures biologiques à l'échelle de la cellule unique avec des mesures métaboliques⁴⁴.

III. ENCOMBREMENT MACROMOLECULAIRE ET PRESSION DE CROISSANCE

Encadrement sur cette partie :

- Post-doctorant : Zacchari Ben Mériem
- Etudiant.e.s en thèse : Baptiste Alric, Lucie Albert, Tiphaine Matéo, Laure Le Blanc

Comme présenté en introduction, nos résultats et ceux de nos collègues montrent que la prolifération sous confinement / contrainte compressive diminue chez les plantes^{14,15}, les cellules animales¹⁶⁻¹⁸, les levures¹⁹⁻²¹ ou encore les bactéries^{22,23}. De plus, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la dynamique de développement de la pression de croissance, une fois renormalisée, semble similaire chez les cellules animales, les levures, et les bactéries (Figure 7). L'ensemble de ces deux résultats guide en partie nos hypothèses de recherche vers une réponse commune et probablement conservée aux contraintes compressives. Ces organismes ayant largement divergé d'un point de vue évolutif, nous nous sommes penchés sur une hypothèse d'origine biophysique, qui sera étudiée dans ce chapitre et le suivant : la variation d'une propriété intrinsèque des cellules, l'encombrement macromoléculaire, pourrait être à l'origine de cet impact sur la prolifération cellulaire. Dans ce troisième chapitre, nous allons présenter l'encombrement macromoléculaire, ce qui le régit, comment nous pouvons le mesurer, et comment il varie sous contrainte mécanique.

Les méthodes de mesure ont principalement été développées durant mon second post-doctorat. L'encombrement macromoléculaire est une propriété essentielle des cellules mais dont les conséquences *in vivo* restent finalement peu étudiées. Notre axe de recherche représente ainsi une approche orthogonale aux études plus classiques de mécano-biologie qui se focalisent principalement sur la tension de membrane des cellules comme propriété biophysique principale et impactée par la mécanique.

L'encombrement macromoléculaire : propriété biophysique par les tous les organismes

Tout cellule, qu'elle soit un procaryote ou un eucaryote (bas ou haut), possède, à une échelle locale de quelque centaine de nanomètres, un cytoplasme de composition relativement similaire : des ribosomes qui, avec des ARN messagers (ARNm), participent à la création de protéines, lesquelles ont une activité biochimique nécessaire à certaines fonctions cellulaires. La composition fine du cytoplasme varie d'un organisme à l'autre, et est très polydispense : les protéines, nanométriques, sont plus petites que les ribosomes (environ 30nm) eux-mêmes plus petits que les ARNm. Les concentrations en protéines et ribosomes sont grandes : il y a par exemple chez la levure *S. cerevisiae* environ 1.5 million de protéines et 15000 ribosomes par μm^3 , ce qui amène à une fraction volumique occupée dans le cytoplasme respectivement d'environ 5% et 20%. La fraction volumique de ribosomes est notamment très large : elle est à mettre en regard de la fraction volumique d'un empilement aléatoire compact de sphères dures qui est de l'ordre de 64%⁴⁵.

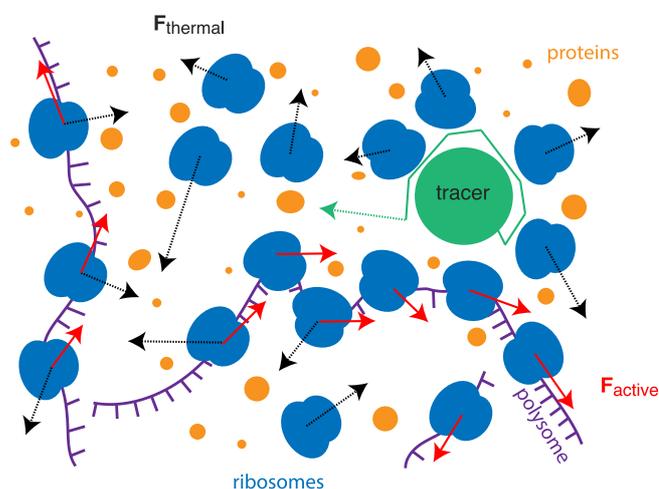


Figure 9 : L'encombrement macromoléculaire est relié à la manière dont les espèces bougent, et peut être influencé aussi bien par la composition que par l'activité biochimique.

La présence de protéines et de ribosomes diminue la mobilité des espèces dans les cellules. Par exemple, la GFP (protéine fluorescent dans le vert) diffuse environ 20 fois plus lentement dans le cytoplasme d'une levure que dans de l'eau⁴⁶, et la diffusion de traceurs de grande taille (plusieurs dizaines de nm) dépend largement de la concentration de ribosomes³⁷. A contrario, l'activité biochimique semble fluidifier l'environnement localement^{47,48}, probablement par les changements de conformation des protéines lors de l'hydrolyse de l'ATP.

Nous appelons communément « encombrement macromoléculaire » l'ensemble des propriétés qui impactent le mouvement des espèces dans la cellule (Figure 9). Entrent ainsi dans cette définition la composition en taille et la concentration des différentes espèces, les potentielles interactions qu'elles peuvent avoir, mais également l'activité biochimique. L'encombrement macromoléculaire dépend très fortement de la taille des objets étudiés³⁷. La densité intracellulaire, qui est reliée à la concentration globale des protéines, n'est en ce sens qu'une sous-partie de l'encombrement : deux cellules peuvent avoir la même densité mais des mouvements de particules différents selon la composition amenant à cette densité (100g/L de petites protéines n'aura pas le même effet sur la mobilité des objets que 100g/L de ribosomes), ou encore selon l'activité biochimique moyenne.

L'impact de l'encombrement macromoléculaire sur les réactions biochimiques a été principalement étudié *in silico* et *in vitro*, avec peu d'études *in vivo*^{37,49-51}. Parmi ses effets notables, l'encombrement macromoléculaire

peut influencer les taux de réactions (Figure 10) : la réaction entre deux substrats, au-delà de l'affinité de ces substrats entre eux, dépend également de leur probabilité de rencontre, laquelle dépend de leur concentration mais aussi de leur mobilité respective. Or, l'encombrement macromoléculaire diminuant la mobilité des protéines, toute réaction biochimique peut finalement être limitée physiquement, par une augmentation de l'encombrement. Il a récemment été montré qu'une augmentation de l'encombrement pouvait ainsi ralentir la réponse à une contrainte osmotique⁵², diminuer la synthèse des microtubules, en jouant sur les taux de polymérisation / dépolymérisation⁵³, ou encore limiter la synthèse de protéines⁴⁰ – nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant.

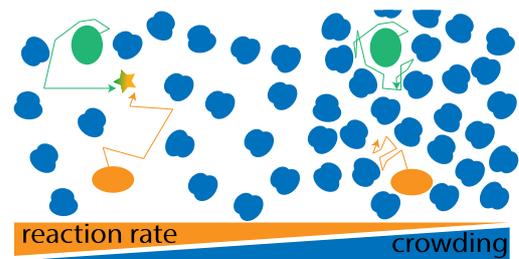


Figure 10 : L'encombrement macromoléculaire diminue le taux de réaction en limitant la diffusion des espèces.

Insistons, encore une fois, sur le caractère universel de cette propriété biophysique. Toutes les cellules ont un cytoplasme encombré. Cet encombrement peut varier selon l'organisme : il semble par exemple que les bactéries aient une fraction volumique de ribosomes de l'ordre de 25-30%⁵⁴, alors qu'elle est de 20% pour les levures³⁷, et estimée à 15% pour les cellules mammifères (données personnelles). Mais malgré ces différences, l'impact de cet encombrement, et en particulier sa modulation sous conditions de stress, peut avoir des répercussions similaires pour différents organismes, étant basées sur des propriétés physiques et non sur des réponses biologiques spécifiques. Bien sûr, cela ne signifie pas pour autant qu'une régulation biologique n'existe pas, celle-ci pouvant par ailleurs être spécifique à l'organisme : cela signifie qu'elle serait, le cas échéant, superposée à ces effets physiques, et que sa régulation en dépendra probablement.

Suivi de particule unique pour mesurer l'encombrement macromoléculaire

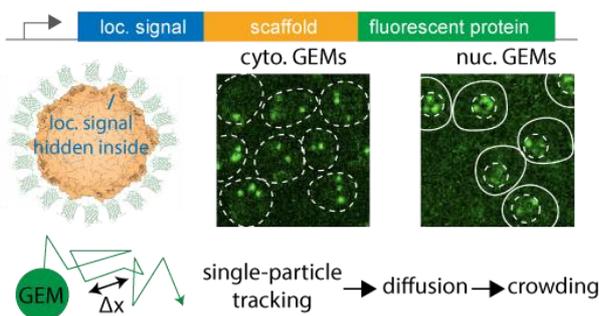


Figure 11 : Nanoparticules génétiquement encodées (GEMs) que nous pouvons suivre à l'échelle de la particule unique. Ce suivi nous permet de remonter à la diffusion de ces particules et à une estimation de l'encombrement à l'échelle de taille caractéristique de la particule.

La mesure de l'encombrement macromoléculaire *in vivo* est une tâche assez complexe. Elle peut se faire par imagerie. Nous n'allons pas faire étalage ici de toutes les méthodes qui existent, ce n'est pas le but de ce manuscrit. Nous allons en revanche présenter la méthode principalement utilisée dans l'équipe pour estimer cet encombrement localement, et qui consiste en un suivi de particule unique. Nous avons récemment développé une nouvelle technologie qui consiste à encoder génétiquement une protéine dérivée de l'encapsuline de l'hyperthermophile *P. furiosus*, capable de multimériser pour former des cages de quelques dizaines de nanomètres (Figure 11). En fusionnant en C-terminus de cette protéine une protéine fluorescente, nous pouvons visualiser ces particules dans les cellules. Nous avons mesuré par cryo-électro-tomographie que leur taille était de 40nm³⁷. La multimérisation de ces protéines en nanoparticules, que nous appelons GEMs pour « genetically-encoded multimeric nanoparticles » se fait de telle manière que la partie N-terminus de la protéine se retrouve cachée à l'intérieur de la particule. Nous pouvons profiter de cette propriété pour fusionner, en N, un signal de localisation : le monomère sera alors transporté dans le compartiment correspondant à ce signal de localisation, puis caché à l'intérieur de la particule lorsque celle-ci sera assemblée. Nous avons ainsi pu réaliser des GEMs qui ont une localisation nucléaire (nucGEMs)⁵⁵.

Ces particules ont de nombreux avantages : (i) elles sont génétiquement encodées, et donc naturellement exprimées par les cellules, ce qui les rend directement utilisables sans avoir recours à une injection ; (ii) elles sont localisables dans différentes organelles, en ajustant le signal de localisation ; (iii) elles sont bien déterminées en taille par la stœchiométrie du multimère, et nous pouvons adapter leur taille en changeant de monomère ; (iv) elles sont brillantes, s'agissant de 120-mères, chaque monomère possédant une protéine fluorescente ; (v) enfin, elles sont a priori encodables dans n'importe quel organisme. Nous et nos collègues les avons encodées dans des bactéries comme *E. coli* ou *N. meningitidis*, des levures comme *S. cerevisiae*, *S. pombe* ou *C. albicans*, plusieurs lignées de cellules mammifères, ou encore des cellules végétales comme de la mousse *Physcomitrella patens* ou le modèle *A. thaliana*.

Leur versatilité et robustesse en font un outil de choix pour étudier la rhéologie intracellulaire. Grâce à elles, nous avons par exemple montré que les ribosomes impactaient largement le mouvement de particules à une échelle « mésoscopique » intermédiaire entre l'échelle nanométrique des protéines et l'échelle de la centaine de nanomètre, et ce, à la fois chez les levures et chez les cellules mammifères³⁷.

Les GEMs sont assez brillantes pour être suivies individuellement sur plusieurs secondes, grâce à une microscopie spinning-disk et une cadence d'acquisition rapide (100Hz). Nous récupérons de cette imagerie, après une analyse faite sur FIJI grâce au plugin Mosaic, des centaines de trajectoire (x,y,t). Ces trajectoires peuvent ensuite être analysées pour déterminer comment le mouvement de ces particules s'effectue, et comment certaines conditions peuvent impacter ce mouvement. Une partie non négligeable de notre recherche actuelle est d'identifier et de modéliser les paramètres influençant le mouvement de ces particules.

Diffusion de particules dans les cellules : étude des caractéristiques rhéologiques

Le type de mouvement diffusif le plus connu est le mouvement brownien. Dans ce mouvement, de la collision aléatoire de particules résulte une distribution gaussienne de tailles de déplacement, échantillonnée sur une fenêtre de temps τ . Cette gaussienne a une moyenne nulle et une déviation standard $\sigma = \sqrt{2dD\tau}$, avec d la dimension du déplacement et D le coefficient de diffusion de la particule qui diffuse. Nous pouvons définir pour ce type de mouvement le déplacement quadratique moyen (MSD pour « mean square displacement » en anglais) qui correspond dans le cas brownien au carré de la déviation standard : $MSD(\tau) = 2dD\tau$. La MSD est une mesure de la déviation d'une particule par rapport à sa position initiale : plus le temps d'échantillonnage est long, ou plus le coefficient de diffusion est grand, et plus la particule aura dévié de sa position initiale. Notons ceci dit qu'il s'agit d'une déviation : la position moyenne de la particule ne change pas.

Ce mouvement est utilisé comme référence pour désigner d'autres types de déplacements qui pourraient avoir lieu dans des milieux plus complexes, comme par exemple le milieu intracellulaire. La **Figure 12** ci-dessous représente ces différents types de mouvements :

- Un mouvement diffusif anormal, qui peut résulter d'interactions électrostatiques ou stériques, et ralentit localement le mouvement. La MSD qui en découle est sous-linéaire, et souvent modélisée par une loi de puissance avec un exposant $0 < \alpha \leq 1$.
- Un mouvement confiné, qui résulte de la diffusion dans un endroit que la particule explore entièrement, amenant à une saturation de sa MSD ($\alpha = 0$). La particule peut éventuellement s'échapper de cet endroit pour entrer dans un autre : c'est typiquement ce qu'il se passe dans les membranes plasmiques où les particules explorent des domaines membranaires⁵⁶. La MSD saute alors d'un régime permanent à un autre.
- Une diffusion dirigée, par exemple à vitesse constante, qui résulte en une MSD super-linéaire, souvent caractérisée par une loi de puissance avec un exposant $2 \geq \alpha \geq 1$ ($\alpha = 2$ à vitesse constante). Ce type de mouvement est typiquement celui de moteurs moléculaires dans les cellules.

Remarquons que la pente initiale de la MSD est la même dans tous les cas si le milieu effectif dans lequel diffuse la particule est le même : la diffusion effective à temps très court est similaire.

En étudiant le mouvement des GEMs de 40nm dans les cellules *S. cerevisiae*, nous avons été amenés à faire les conclusions suivantes :

1. Nous observons une grande gamme de types de mouvements dans la cellule, allant du mouvement aléatoire à une diffusion anormale voire confinée pendant quelques secondes, ou encore un mouvement dirigé durant lequel la particule peut parcourir plusieurs μm en moins d'une seconde.
2. Bien que ces mouvements soient différents, nous pouvons mesurer le coefficient de diffusion pour toutes ces trajectoires sur un temps court (**Figure 12**). Le coefficient de diffusion moyen, mesuré alors à 10ms,

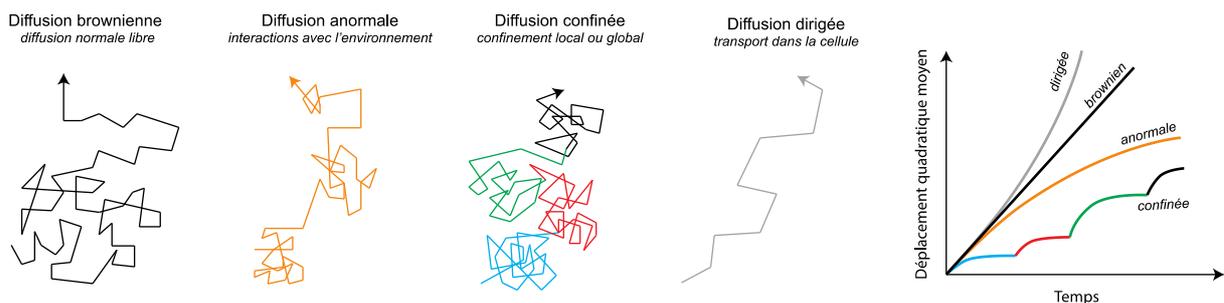


Figure 12 : Différents types de mouvements diffusifs, et leur déplacement quadratique moyen (MSD) typique. La pente à temps courts est la même pour tous les types de mouvements si l'environnement effectif est le même.

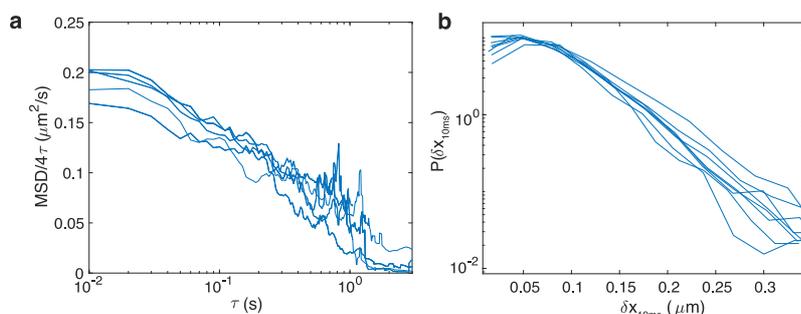


Figure 13 : Diffusion des GEMs dans le cytoplasme de la levure *S. cerevisiae*. a. Coefficient de diffusion $D = \text{MSD}/4\tau$ en fonction de τ . Nous pouvons extraire et mesurer la valeur du coefficient de diffusion à 10ms qui vaut environ $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$. b. Distribution de taille des pas mesurée à 10ms.

dizaines de ms, il diminue avec le temps d'observation. Ce type de comportement pourrait être expliqué par une diffusion anormale⁵⁷, mais également par un confinement.

- La distribution de taille de pas, enfin, présente à 10ms une longue queue exponentielle, ce qui est en contradiction avec un mouvement brownien, même dans un milieu plus visqueux (qui pourrait expliquer une diffusion plus lente, cf. point 2). Ce genre de comportement a déjà été observé dans d'autres systèmes et affublé du nom de diffusion « anormale pourtant brownienne »⁵⁸, du fait d'une MSD linéaire dans le temps mais d'une distribution de taille de pas possédant une queue exponentielle. En réalité, elle pourrait émerger d'interactions stériques⁵⁹ ou de l'hétérogénéité du milieu⁶⁰.

Une grande partie de notre recherche actuelle est de comprendre ce type de mouvement, pour unifier toutes ces observations sous un modèle de diffusion simple. Nous collaborons avec Efe Ilker, théoricien spécialiste de la diffusion, et combinons expérimentation, simulations numériques, et théorie. Les grands résultats qui se détachent de nos analyses pointent vers une diffusion brownienne ralentie par la présence de protéines (plus grande viscosité), et bloquée à des échelles de temps de la μs à la dizaine de ms par les ribosomes, agissant comme un colloïde de sphère dure. Le tout diffuse dans un espace confiné, ralentissant la MSD sur des temps longs ($\geq 100\text{ms}$). Nous observons que les échelles de temps ne semblent pas vraiment séparées : les particules n'entrent pas vraiment dans un régime stationnaire de diffusion dans le milieu colloïdal effectif avant de ressentir le confinement de ce milieu. Cela pose de nombreuses questions sur les interprétations des MSD et des coefficients de diffusion. Une particule peut par exemple avoir un mouvement qui semble sous-diffusif car étant anormale (MSD sous-linéaire), mais qui correspondrait en fait à des interactions stériques doublées d'un confinement. Dans ce cas, comment définir le coefficient de diffusion est une question très complexe, car dépendant grandement du temps auquel cette quantité est observée.

Enfin, nous portons une attention toute particulière à l'activité biochimique, et son rôle sur la diffusion. Etudier son rôle expérimentalement n'est pas aisé : dépléter totalement l'ATP dans les cellules, par un empoisonnement des mitochondries et de la glycolyse, est en soi faisable. Ceci dit, l'activité régule nombre de paramètres comme le pH ou encore une forme de turgescence. Ainsi, de nombreux contrôles sont nécessaires pour nous assurer que les effets observés correspondent bien à ce que nous voulons perturber (l'activité biochimique), et non pas à un effet secondaire comme un changement de pH ou de volume cytoplasmique.

Diffusion similaire des GEMs chez plusieurs organismes

Comme précisé plus haut, nous avons encodé les GEMs de 40nm dans différents organismes : des bactéries (*E. coli*), des levures (*S. cerevisiae*) et des cellules cancéreuses mammifères. Notre premier constat est que le cytoplasme de *E. coli* est plus encombré que celui de *S. cerevisiae*, lui-même plus encombré que celui de cellules mammifères (insert Figure 14). Ce résultat corrobore nos estimations et mesures de la fraction volumique de ribosomes, qui est plus grande pour *E. coli* que pour *S. cerevisiae* et les cellules mammifères.

Ce qu'il y a de particulièrement intéressant est que toutes les conclusions que nous avons tirées sur le type de

est de $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Figure 13a), environ 50 fois inférieur à ce qu'il serait pour une particule sphérique de 40nm dans de l'eau (estimé à $11\mu\text{m}^2/\text{s}$ par la relation de Stokes-Einstein).

3. Nous pouvons calculer le coefficient de diffusion à partir de la MSD, en divisant celle-ci par 4τ (4, car nous imageons en 2-dimensions). Celui-ci est tracé pour plusieurs réplicats en Figure 13a. Nous remarquons qu'après ce qui semble être un court plateau de quelques

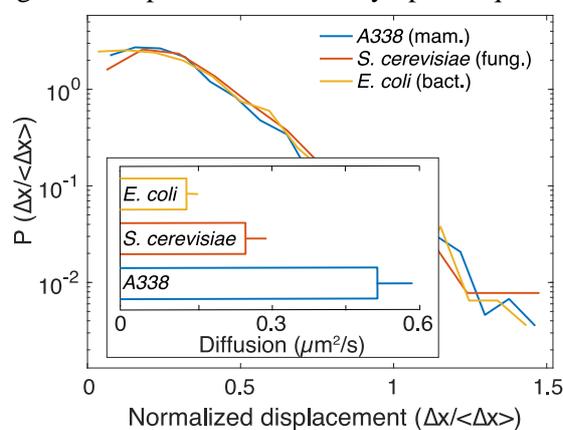


Figure 14 : Distribution des déplacements normalisés par le déplacement moyen pour différents organismes. Insert: Coefficient de diffusion mesuré pour ces mêmes organismes.

diffusion chez *S. cerevisiae* semblent également valides dans ces autres organismes. Ceci prédit en particulier que si nous renormalisons le déplacement dans un organisme par le déplacement moyen, alors la distribution de ces déplacements devrait être similaire, et exhiber également une queue exponentielle aux mêmes échelles de temps de la dizaine de ms – ce que nous observons (Figure 14).

Ces résultats renforcent notre intuition que la diffusion doit avoir des règles de fonctionnement assez semblables dans différents organismes. Si ces règles sont similaires, la manière dont la diffusion est affectée pourrait également l'être, ce qui amènerait à une réponse biophysique, sous compression mécanique, potentiellement analogue, comme nous l'avons observé en Figure 7. Nous allons maintenant discuter de comment l'encombrement est modifié lorsque les cellules prolifèrent sous confinement et développent de la pression de croissance.

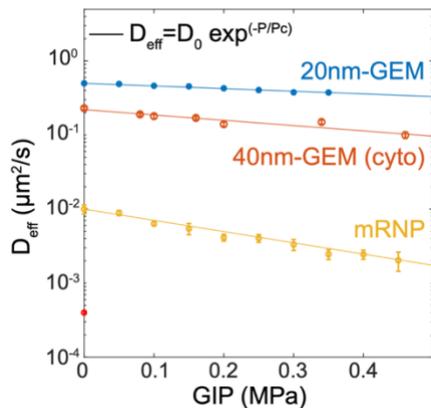


Figure 15 : Coefficient de diffusion mesuré à 10ms de différentes particules (GEMs de 20nm et 40nm, et particules d'ARN messenger (mRNP)), en fonction de la pression de croissance (GIP).

Impact de la croissance confinée sur l'encombrement macromoléculaire

Nous avons cherché à savoir comment l'encombrement macromoléculaire dépendait de la pression de croissance. Nous avons pour ceci mesuré le coefficient de diffusion à 10 ms de différentes particules : des GEMs de 20nm, des GEMs de 40nm ; et des particules d'ARN messenger (ARNm) d'environ 80nm, qui correspondent à des ARNm possédant des répétitions d'un motif interagissant avec la protéine MS2 taguée avec une GFP pour pouvoir les visualiser. Nous observons que la diffusion de ces particules décroît avec la pression de croissance, et ce de manière exponentielle, avec une pression caractéristique qui diminue avec la taille des particules diffusantes (Figure 15). Notons que la diffusion de GEMs de 40nm diminue également avec la pression de croissance chez la bactérie *E. coli* (données non montrées).

La Figure 16 schématise notre modèle expliquant l'origine de la pression de croissance, et pourquoi les cellules deviendraient plus encombrées sous confinement. Nous supposons que la création de biomasse et d'osmolyte (soit création pure, comme la production de glycérol chez *S. cerevisiae*, soit un import) se fait de manière totalement proportionnelle. Comment ce couplage s'effectue précisément est une question très intéressante à laquelle nos travaux contribuent, mais pour laquelle il n'existe pas encore de réponse. Deux pistes à explorer pourraient être un couplage par la tension de membrane, ou par l'encombrement lui-même. Dans un cas de croissance libre, la création d'osmolyte et de biomasse amène à une augmentation de l'osmolarité intracellulaire et de l'encombrement. Cette augmentation de l'osmolarité résulte d'un accroissement du volume cellulaire (croissance) et notamment un influx d'eau, qui dilue l'ensemble et permet une homéostasie de paramètres tels que l'encombrement ou l'osmolarité. En revanche, lorsque la croissance est confinée, l'accroissement du volume cellulaire est limité : cela résulte en une accumulation progressive à la fois des osmolytes et de l'encombrement. L'augmentation de l'osmolarité intracellulaire se mesure par la pression de croissance qui en émerge directement. L'augmentation de l'encombrement est quant à elle mesurée par les GEMs (Figure 15).

La variation exponentielle de l'encombrement avec la pression de croissance découle directement de ce modèle et de ce couplage entre création d'osmolytes et de biomasse. Nous avons montré précédemment³⁷ que les propriétés rhéologiques du cytoplasme de *S. cerevisiae* et des cellules mammifères étaient bien décrites par l'équation phénoménologique de Doolittle, modélisant une variation de la diffusion en fonction de la fraction volumique. Cette description est compatible avec nos conclusions de la partie précédente, l'équation de Doolittle ayant été dérivée par Cohen et Turnbull dans le cas d'un colloïde de sphères dures⁶¹. En couplant l'équation de Doolittle avec l'équation de van't Hoff, et

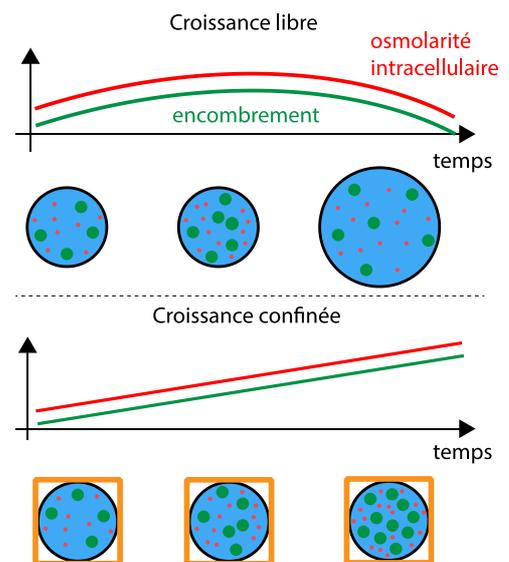


Figure 16 : Schéma de principe de l'évolution de l'osmolarité intracellulaire ainsi que de l'encombrement dans le cas d'une croissance libre ou confinée. Crédit : B. Alric.

en écrivant que la pression de croissance P correspond à la surpression osmotique du cytoplasme par rapport à la pression osmotique intracellulaire basale ($P = \Pi_i - \Pi_i^0$, avec Π_i et Π_i^0 respectivement la pression osmotique du cytoplasme sous confinement ou en croissance libre), nous pouvons montrer que le coefficient de diffusion dépend exponentiellement de la pression de croissance⁴⁰. Nous avons réussi à calibrer la pression caractéristique pour les GEMs de 40nm, si bien que la courbe tracée pour ces particules sur la [Figure 15](#) correspond à une prédiction du modèle, qui s'avère être excellente. Plus de détails calculatoires sont disponibles dans la Ref. 40.

Augmentation de l'encombrement macromoléculaire nucléaire sous pression

L'encombrement macromoléculaire augmente donc dans le cytoplasme des levures et des bactéries, de manière prédictive dans le cas des levures. Cette augmentation est théoriquement concomitante à une augmentation des espèces dans la cellule à toutes les échelles de taille (osmolytes, protéines, ARNm, ribosomes, complexes protéiques, etc.), en l'absence de régulation spécifique. Ces augmentations de concentration dans le cytoplasme doivent évidemment avoir des répercussions sur le volume d'autres organelles, et ainsi que sur leur encombrement.

Ceci est notamment le cas du noyau. En utilisant les GEMs de 40nm ayant un signal de localisation nucléaire⁵⁵, nous avons pu mesurer comment la diffusion à une échelle de taille donnée pouvait dépendre de la localisation subcellulaire et de la pression de croissance ([Figure 17](#)). Nous avons ainsi observé que la diffusion des GEMs de 40nm dans une condition non perturbée était la même dans les deux compartiments, résultat déjà très intéressant en soi, mais que nous ne pouvons expliquer pour le moment⁵⁵. Nous avons également mesuré que l'encombrement macromoléculaire augmentait aussi dans le noyau avec la pression de croissance, et semblait avoir exactement la même dépendance en termes de pression que dans le cytoplasme.

Nous avons observé que le volume du noyau diminuait avec la pression de croissance⁴⁰. Le noyau possède des pores permettant le passage non-régulé de petites espèces, avec un seuil de taille à environ 5nm : toute espèce supérieure à cette taille ne pourra être importée que par des mécanismes actifs. Ainsi, l'accumulation d'espèces supérieures à 5nm dans le cytoplasme peut créer une pression colloïdale exercée sur le noyau, proportionnelle à la pression de croissance et à l'encombrement, et qui le comprimerait progressivement. Cette compression augmenterait alors l'encombrement dans ce compartiment avec potentiellement la même dépendance en pression de croissance que celle observée dans le cytoplasme. Un tel modèle est par ailleurs compatible avec nos données⁴⁰.

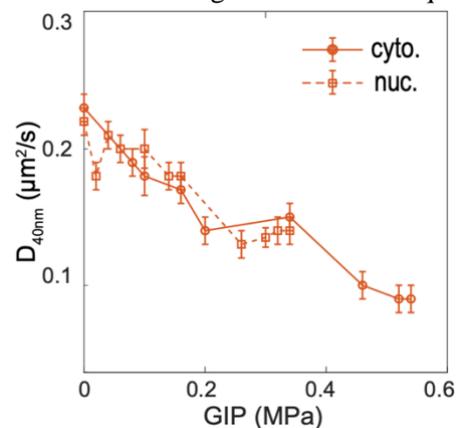


Figure 17 : Coefficient de diffusion dans le cytoplasme et dans le noyau des GEMs de 40nm mesuré à 10ms en fonction de la pression de croissance. Crédit : B. Alric.

Conclusions et Perspectives

Le cytoplasme des cellules, procaryotes comme eucaryotes, est très encombré de macromolécules. Leur présence réduit fortement la diffusion de traceurs dans le cytoplasme par rapport à une diffusion dans de l'eau, avec une diffusion ralentie d'un facteur 50 pour des particules de 40nm. De plus, la diffusion ne peut être caractérisée de brownienne, avec des caractéristiques comme la distribution de taille de pas présentant une queue exponentielle au lieu d'une plus simple gaussienne.

Nous avons commencé à déchiffrer comment les différentes propriétés intracellulaires pouvaient influencer le mouvement de particules. Parmi ces propriétés, une viscosité effective émerge des interactions stériques et électrostatiques avec les protéines ; une fraction volumique significative de ribosomes confère à ce milieu des propriétés de colloïdes de sphères dures ; et un confinement local à une échelle de plusieurs centaines de nanomètres diminue la MSD avec le temps. L'activité biochimique semble également jouer un rôle : des résultats préliminaires obtenus avec notre collaborateur Liam Holt semblent montrer que la diffusion des GEMs de 40nm diminuerait presque d'un facteur 2 lorsqu'il n'y aurait pas d'activité.

Une grande partie de nos activités actuelles consiste donc à poursuivre l'étude des propriétés rhéologiques des cellules, et à déterminer les similitudes entre organismes, comme la distribution de taille de pas. Le rôle de l'activité est un point central sur lequel nous allons focaliser notre attention. Mieux comprendre comment les espèces bougent dans les cellules est essentiel pour dégager des propriétés générales, et voir notamment si

l'encombrement varie de manière similaire sous pression de croissance. Il nous apparaît essentiel de savoir si la décroissance exponentielle observée se retrouve dans d'autres organismes, et même si, plus simplement, l'encombrement augmente dans les cellules mammifères également.

Nous allons également nous attacher à étudier l'encombrement dans d'autres compartiments cellulaires, comme le réticulum endoplasmique, le Golgi, ou encore les mitochondries. L'osmorégulation de ces compartiments n'est absolument pas étudiée, et des changements relatifs sous pression de croissance de l'encombrement dans ceux-ci pourraient apporter des réponses inattendues. Par-delà les compartiments possédant une membrane / enveloppe comme ceux sus-cités, nous focaliserons également notre attention sur des compartiment formés par séparation de phase, comme notamment le nucléole. Nous avons observé (résultats non montrés) que cette sous-partie du noyau était de plus en plus condensée à mesure que la pression de croissance, et donc l'encombrement nucléaire, augmentait. La synthèse de l'ARN ribosomal étant réalisée dans ce compartiment, des changements de ses propriétés pourraient avoir des conséquences sur la production des ribosomes, et pourraient donc rétro-agir physiquement et peut-être même passivement contre l'augmentation de la quantité de ribosomes. De manière générale, la recherche de mécanismes physiques induits par l'encombrement, ou tout simplement le régulant, est un axe de recherche fort et émergent de nos thématiques.

Enfin, bien que nous focalisions nos efforts de recherche sur l'encombrement et ses effets, nous pensons que la tension de membrane, autre paramètre physique important de la cellule, peut aussi être impacté par la pression de croissance : nous allons ainsi initier des mesures de celle-ci, dans divers organismes, sous pression de croissance.

IV. IMPACT DE LA PRESSION DE CROISSANCE SUR LA PROLIFERATION

Encadrement sur cette partie :

- Post-doctorant : Zacchari Ben Mériem
- Ingénieur : Julien Faccini
- Etudiant.e.s en thèse : Baptiste Alric, Lucie Albert, Tiphaine Matéo, Laure Le Blanc, TERENCE Desclaux, Claire Lac, Sanzhar Aitbay, Ilaria Rizzuti

La prolifération sous confinement doit impliquer une réduction de celle-ci, comme expliqué en introduction. Très logiquement, une cellule ne peut croître indéfiniment sous confinement : pour cela, il lui faudrait déplacer les frontières de son environnement et ainsi développer toujours plus de pression. On imagine aisément qu'une pression infinie ne peut être développée, ou, qu'à terme, le matériau rompt (que ce soit l'environnement ou les cellules elles-mêmes). De même, la division cellulaire doit nécessairement s'arrêter si les cellules ne peuvent croître, sinon elles deviendraient de plus en plus petites, voire inférieures à la taille de leur noyau. Au-delà de ces deux limites physiques, une troisième doit exister, en l'absence de régulation biologique : si l'augmentation de l'encombrement est inhérente à la pression de croissance, par un couplage entre la production d'osmolytes dont elle émerge et la production de biomasse encombrant le cytoplasme, alors l'encombrement devrait augmenter tant que les cellules prolifèrent, et devrait atteindre un niveau tel que le cytoplasme se gélifierait totalement (transition de blocage).

Ces limites intrinsèques étant posées, l'observation expérimentale est en effet que les cellules prolifèrent de moins en moins sous confinement et contrainte compressive. Par ailleurs, aucun mécanisme biologique n'a été trouvé à ce jour permettant d'expliquer cette réduction. Des mécanismes biologiques doivent bien exister, notamment pour réguler l'encombrement, mais se superposent aux limites physiques présentées ci-dessus. L'encombrement étant une propriété universelle qui a le potentiel d'impacter grand nombre de processus intracellulaires, nous avons émis l'hypothèse, qui constitue le socle de notre projet de recherche, que la réduction de prolifération sous confinement était induite par une augmentation de l'encombrement. Cette réduction pourrait être directe (blocage « cinétique » de la prolifération) ou indirecte (induction par l'encombrement de voies de signalisation réduisant la prolifération). Nous pensons que la réponse peut ne pas être la même en ce qui concerne la croissance et la division cellulaire, que nous étudions indépendamment.

Notre approche constitue un nouvel axe de recherche en mécano-biologie, qui émerge à peine : comprendre comment des modulations de l'encombrement macromoléculaire peuvent impacter la physiologie cellulaire. Nous verrons que de nombreuses questions en découlent, et alimentent notre projet de recherche.

Réduction de la croissance sous confinement de *S. cerevisiae*

La mesure des courbes de pression de croissance nous a montré que cette dernière ralentissait avec le temps (Figure 18a), et ce pour tous les organismes (Figure 7). Comme discuté plus en avant, la pression de croissance émerge de la production d'osmolytes. Si la génération de pression diminue, cela signifie que la production d'osmolytes devrait diminuer avec la pression, et par conséquent, la production de biomasse.

Nous avons ainsi mesuré le taux de croissance des cellules sous confinement, et observé que ce dernier diminuait avec la pression (Figure 18b). Cette diminution semble par ailleurs être exponentielle.

Nous n'avons pas connaissance d'autres mesures de ce type dans la littérature. Nous avons également observé chez d'autres levures comme *S. pombe* ou *C. albicans* une diminution de la croissance sous confinement (données non montrées). Durant ma thèse, nous avons démontré que chez les mammifères, la compression osmotique par de grosses molécules de dextrans de sphéroïdes multicellulaires engendrait une diminution exponentielle de la croissance^{62,63}. Cependant, même si de récents travaux commencent à donner une explication sur la manière dont ce type de compression osmotique peut agir au niveau de sphéroïdes⁶⁴, la manière dont cette contrainte agit reste encore peu défini.

Réduction de la biosynthèse sous pression de croissance

Notre hypothèse sur le couplage entre la production d'osmolytes, dont résulte la croissance et la pression de croissance, et la production de biomasse, dont résulte l'encombrement, est que si le taux de production d'osmolytes diminue, alors le taux de production de protéines doit également diminuer. Cette diminution de la biosynthèse sous pression pourrait être à l'origine de la réduction de croissance.

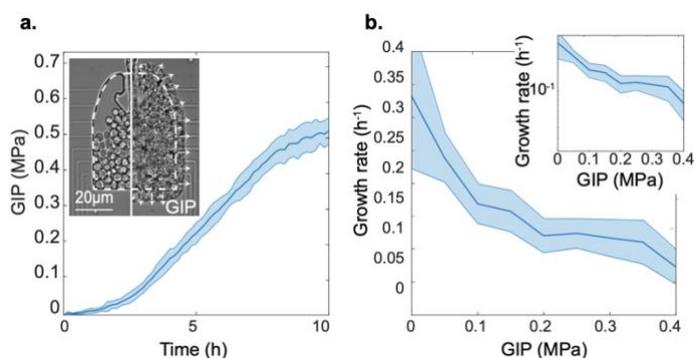


Figure 18. a. Dynamique de la pression de croissance (GIP). b. Taux de croissance en fonction de la pression de croissance. Insert : Même courbe tracée en échelle semi-logarithmique. Crédit : B. Alric.

Afin d'étudier cette question, nous avons utilisé un rapporteur fluorescent du promoteur codant pour le gène *ADH2*, *P_{ADH2}-mCherry*. Ce dernier peut être induit en retirant le glucose du milieu de culture, ce qui a l'avantage de stopper la croissance et donc la génération de pression de croissance. Nous avons induit ce rapporteur pour des chambres de culture à différentes valeurs de la pression de croissance, et avons observé que l'augmentation de fluorescence semblait diminuer avec la pression de croissance (Figure 19a).

Nous pouvons quantifier l'intensité de fluorescence à l'échelle de la cellule unique et remarquons en effet que l'accumulation de fluorescence diminue avec la pression (Figure 19b). Nous avons développé un modèle simple dans lequel nous considérons qu'après un certain temps moyen d'induction, les cellules produisent l'ARNm puis la *mCherry*. En négligeant les taux de dégradation (voir les SI de la Ref. 40 pour plus de détails), nous montrons que l'accumulation de fluorescence doit suivre une loi quadratique, qui ajuste très bien nos données expérimentales (Figure 19c).

Nous avons montré que le taux de production de protéine diminuait effectivement avec la pression (Figure 19d), et ce, avec une vitesse similaire à ce que nous observons pour le taux de croissance (environ 70% de réduction à une pression de 0.3MPa), ce qui semble compatible avec l'hypothèse que le taux de croissance diminue par une diminution de la production de biomasse.

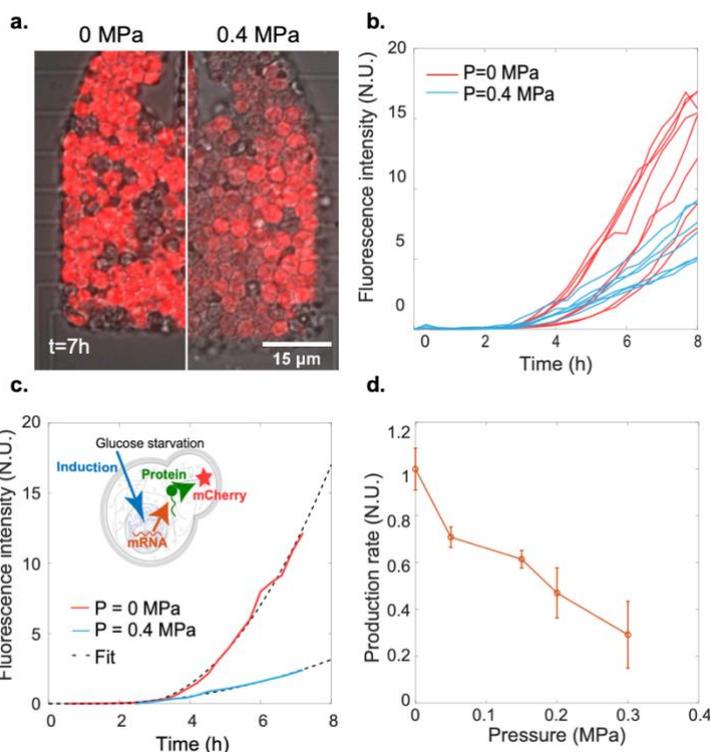


Figure 19 : Impact de la pression de croissance sur la production de protéine. a. Fluorescence au bout de 7h d'induction d'un rapporteur. b. Quantification à l'échelle de la cellule unique de la fluorescence de ce rapporteur. c. Modèle et ajustement quadratique de la production de protéine. d. Variation du taux de production de protéine en fonction de la pression. Crédit : B. Alric.

La biosynthèse semble limitée par l'augmentation de l'encombrement

La réduction de la biosynthèse peut avoir plusieurs origines. Nous avons émis l'hypothèse que cette réduction était intrinsèquement reliée à l'augmentation de l'encombrement que nous mesurons sous confinement. Ce point est assez difficile à vérifier : de manière générale, la causalité est complexe à obtenir en biologie. Nous avons décidé d'étudier cette hypothèse en effectuant des contraintes osmotiques sur des levures qui ne peuvent pas osmo-adapter (*HOG1Δ*). Ces contraintes sont orthogonales à la pression de croissance, mais agissent à l'échelle de la cellule de la même manière, en augmentant l'encombrement. Nous utilisons par ailleurs assez

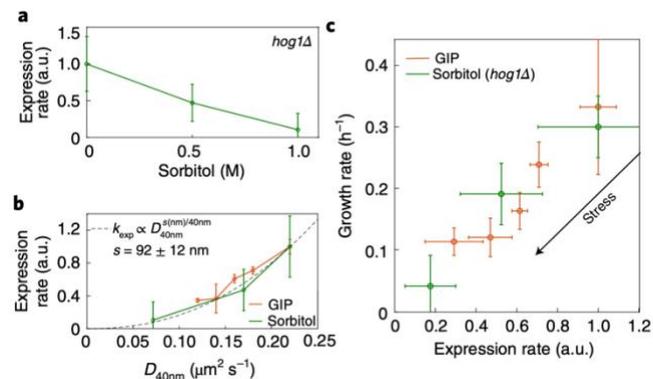


Figure 20. a. Les contraintes osmotiques réduisent aussi le taux de production de protéines. b-c. La réduction de production tracée en fonction de la diffusion des GEMs de 40nm (b) ou du taux de croissance (c) montrent une dépendance similaire que ce soit pour la contrainte osmotique ou la pression de croissance. Crédit : B. Alric.

souvent les contraintes osmotiques dans ce mutant afin de tester des hypothèses purement reliées à l'encombrement.

Dans un premier temps, nous avons montré que le taux de production de protéines, mesuré par le même rapporteur *P_{ADH2}-mCherry*, diminuait également lorsque nous appliquons une contrainte osmotique (Figure 20a). Ce résultat suggère fortement qu'une variation de l'encombrement influence la biosynthèse.

La comparaison directe de ces deux contraintes n'est pas évidente : une pression osmotique de 0.5 MPa ne correspond pas directement à une pression mécanique de la même intensité. Cependant, comme la pression osmotique augmente l'encombrement, nous avons décidé de tracer les taux de production en

fonction de la diffusion des GEMs de 40nm mesurée à 10ms pour les deux contraintes (Figure 20b). Nous remarquons alors que les données pour les deux contraintes se superposent parfaitement. Ce résultat très important suggère que la variation d'encombrement impacte les cellules de la même manière pour ces contraintes orthogonales. De plus, la variation semble suivre une loi de puissance, que nous pouvons expliquer théoriquement en supposant que la biosynthèse soit limitée par la diffusion de substrats⁴⁰.

A ce stade, nous ne savons pas ce qui limite la production de protéine, mais savons seulement que l'encombrement est impliqué. Celui-ci pourrait agir directement, en limitant par exemple la transcription ou la traduction, ou encore le transport de transcrits. Mais il pourrait aussi avoir des effets indirects : nous avons mentionné la compression du nucléole qui pourrait ralentir la production de ribosome, mais il pourrait y avoir d'autres effets de l'encombrement sur certaines réactions biochimiques reliées à la biosynthèse. Ce point précis fait partie de nos perspectives de recherche à court terme.

Modèle prédictif de la réduction de croissance sous confinement

Les résultats précédents suggèrent donc que la réduction de biosynthèse est liée à une augmentation de l'encombrement. Cette réduction de biosynthèse semble proportionnelle à la réduction du taux de croissance des cellules sous confinement (Figure 20c). Ceci nous amène à un modèle théorique que nous avons développé, schématisé dans la Figure 21a, et qui nous permet d'expliquer ce qu'il se passe sous confinement.

Nous supposons ainsi que la biosynthèse produit pour elle-même : les ribosomes aident par exemple à la production de ribosome. Cette hypothèse est souvent utilisée pour décrire des croissances exponentielles⁶⁵. Comme précisé plus haut, les osmolytes sont produits en proportion de la biomasse qui encombre la cellule. La génération d'osmolytes permet la croissance cellulaire qui vient, elle, diluer le cytoplasme et par conséquent diminuer l'encombrement. Nous ajoutons à cela une boucle de rétroaction physique (en orange) : l'encombrement peut diminuer la biosynthèse, même si l'origine de cette diminution n'est pas connue. Lorsque les cellules sont confinées, elles génèrent de la pression de croissance. Celle-ci comprime les cellules, et limite leur expansion, limitant en partie la croissance (boucle de rétroaction en rouge). Ce modèle est entièrement détaillé dans les suppléments de la Ref. 40. Il possède 8 paramètres indépendants que nous avons tous pu calibrer, nous permettant ainsi de tester sa prédictibilité.

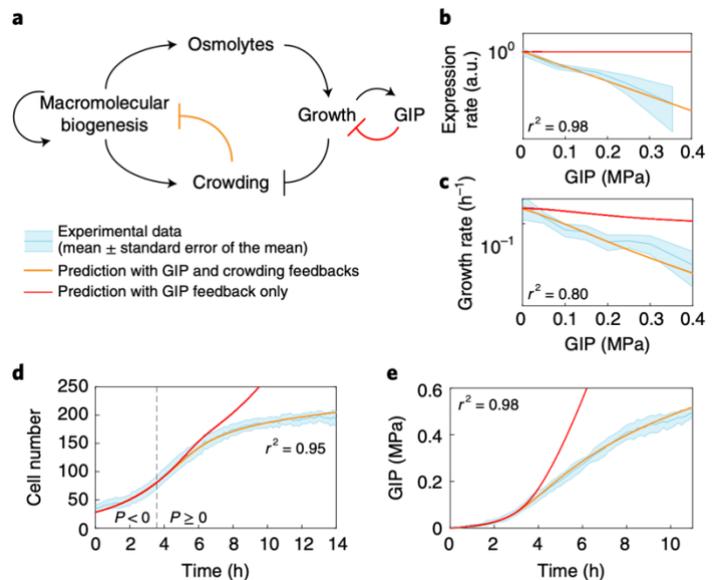


Figure 21 : Modèle de croissance sous confinement et prédiction. a. Modèle. b-e. Prédiction de ce modèle pour la production de protéines (b), le taux de croissance (c), la variation du nombre de cellules (d) et la pression de croissance (e). En rouge, nous traçons la prédiction obtenue s'il n'y avait pas de rétro-action physique de l'encombrement. Crédit : B. Alric.

Nous avons tracé en Figure 21b-e la prédiction de notre modèle, qui s'avère excellente (courbes en orange). Notre modèle étant totalement calibré, nous avons alors pu relaxer la rétroaction de l'encombrement sur la biosynthèse afin de tester son effet relatif (courbes en rouge). Nous remarquons que sans cette rétroaction, la croissance diminue toujours, du fait de la limite de l'extension de la cellule par la pression de croissance grandissante, mais diminue bien plus lentement qu'avec la limite physique de l'encombrement. Ceci a pour effet que la pression de croissance augmente très rapidement. L'encombrement dans la cellule augmente également fortement et plus rapidement qu'avec rétroaction, et devrait par ailleurs imposer une limite haute.

Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de l'encombrement et la rétroaction que celui-ci a sur la biosynthèse est essentielle à la stabilité du système, car il ralentit la croissance sous confinement. Cette limite physique, encore peu étudiée, pourrait a priori être valable pour tous les organismes, mais cela reste encore à démontrer. Nous avons initié ce genre de mesures chez la bactérie *E. coli* et observons des effets qui semblent aller dans le même sens. Nous avons débuté des études sur l'effet de l'encombrement sur la biosynthèse chez les cellules mammifères.

Réduction de la division cellulaire sous confinement

Rappelons que la prolifération est un processus coordonnant croissance et division cellulaire. Cette coordination s'effectue au niveau de points de contrôles, notamment au niveau de la transition G1/S, comme le point Start chez *S. cerevisiae*, ou le point de restriction chez les eucaryotes supérieurs.

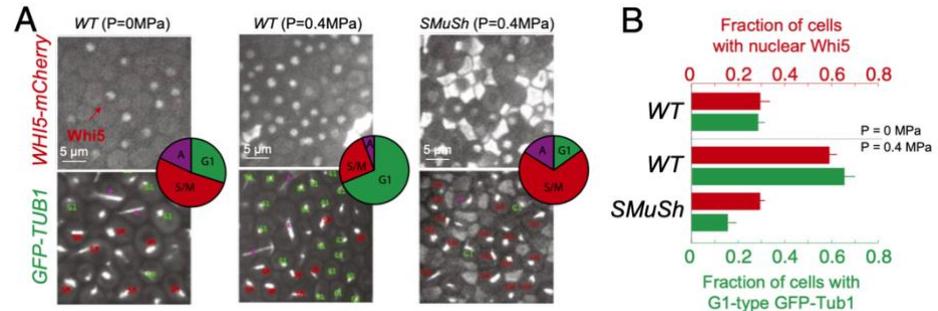


Figure 22 : Diminution de la division cellulaire sous pression de croissance. a. Analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire pour des *S. cerevisiae* libres ou sous pression, et sous pression avec un mutation sur la voie de signalisation *SMuSh*. b. Quantification de cette analyse.

Dans une ancienne étude, nous avons montré que la réduction de croissance était accompagnée d'une réduction du taux de division, les cellules étant arrêtées dans la phase G1 du cycle cellulaire²⁰. Pour ceci, nous avons à la fois mesuré la densité de cellules présentant une localisation nucléaire de la protéine Whi5⁶, mais également la quantité de cellules présentant un aster de la phase G1 par un marquage de la tubuline. L'arrêt dans la phase G1 semble dépendre d'une voie de signalisation que nous avons nommée *SMuSh* et qui, si déléetée, semble à la fois ne pas inhiber la division cellulaire et être reliée à une plus grande lyse des cellules (Figure 22). *SMuSh* est déclenchée par une mucine transmembranaire *Msb2*, et signale par la MAPKKK *Ste11*. Cette dernière a de nombreuses cibles, comme notamment *Hog1*, qui régule la réponse à une contrainte osmotique. Comment exactement *Msb2* ressent la contrainte compressive est encore inconnu, même si nous semblons observer une agrégation de celle-ci sous pression (résultats non montrés).

A ce stade, à part cette régulation par la voie *SMuSh*, nous n'avons pas trouvé, et il n'a pas été fait mention dans la littérature à notre connaissance, de voie de signalisation pouvant contrôler la transition G1/S sous confinement. Certains capteurs du mur cellulaire semblent aussi pouvoir répondre à la compression chez la levure^{66,67}, mais leur implication dans la régulation du cycle cellulaire n'est pas encore montrée. Quelques résultats récents chez les cellules mammifères semblent impliquer une activation de la voie des PI3K par des canaux ioniques mécanosensibles pour la réentrée dans le cycle cellulaire³⁴, mais n'est pas forcément reliée à l'arrêt du cycle.

Nous avons commencé à mener des études similaires chez la bactérie et chez les cellules mammifères. Nous observons en résultats préliminaires que le taux de division ralentit également chez les bactéries, et que les cellules mammifères semblent s'accumuler également dans la phase G1 du cycle cellulaire¹⁶. De plus, une inhibition de la PI3K β impacte fortement la capacité des cellules à proliférer sous pression (résultats non montrés).

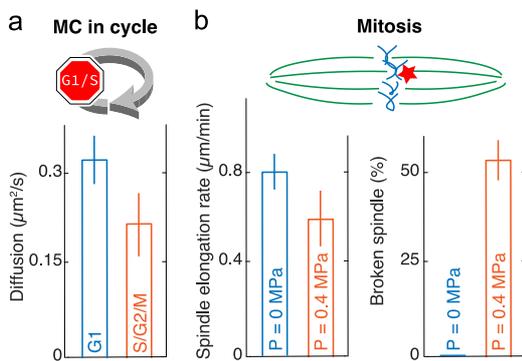


Figure 23. a. Coefficient de diffusion dans différentes phases du cycle cellulaire. b. Impact de la pression de croissance sur la mitose : ralentissement de l'élongation du fuseau mitotique et apparition de cassures de ce fuseau.

Plusieurs hypothèses de contrôle peuvent coexister, comme notamment un contrôle mécanique de cette transition. Nous avons par exemple mesuré que l'encombrement en G1 était plus élevé que dans le reste du cycle cellulaire (Figure 23a). L'origine de ce changement d'encombrement, ainsi que l'influence qu'il peut avoir sur la régulation de la transition G1/S n'est à ce stade pas connu, mais la phase G1 est assez différente des autres d'un point de vue métabolique⁶⁸. Il est probable que cette différence puisse aussi être reliée à l'encombrement.

Au-delà de la transition G1/S, nous avons initié une collaboration avec le groupe de S. Tournier et Y. Gachet sur l'incidence du confinement spatial sur la mitose. Des résultats préliminaires nous montrent que l'augmentation de l'encombrement cytoplasmique et nucléaire s'accompagne d'une diminution de la vitesse d'élongation du fuseau (Figure 23b), en accord avec de récents résultats de la littérature sur l'impact de contraintes osmotiques sur la division⁵³. De plus, cette réduction s'accompagne d'une grande occurrence de brisures du fuseau mitotique (Figure 23b). Nous avons relevé d'autres anomalies durant la mitose, comme la présence de bras de

chromosomes présentant des défauts d'attachement, ou encore des chromosomes entiers ayant un retard durant la ségrégation (résultats non montrés). Ces résultats montrent une potentielle source d'instabilité génomique durant la division sous confinement, comme trouvé chez les mammifères⁶⁹.

Pour conclure cette partie, il semble donc que la division cellulaire ralentisse sous confinement et que les eucaryotes s'accumulent principalement dans la phase G1 du cycle cellulaire, même ceux pour qui cette phase n'est normalement pas une phase de contrôle assez forte (comme *C. albicans* ou *S. pombe* – résultats non montrés). L'origine de cet arrêt, ou ralentissement, n'est pas connu, mais pourrait être relié en partie à l'encombrement macromoléculaire (nucléaire ou cytoplasmique), ou à la compression du noyau (rappelons que la mitose est fermée chez les fongiques).

Coordination entre croissance et division sous pression

Nous avons donc vu que croissance et division diminuaient sous confinement. Dans des conditions normales de prolifération, croissance et division sont coordonnés. Cette coordination peut être différente selon l'organisme, mais implique l'existence de points de contrôles^{7,70,71}. Nous avons commencé à étudier la régulation de ces points sous confinement.

Chez *S. cerevisiae*, la diminution de croissance s'accompagne de manière proportionnelle à l'échelle de la population de cellule, d'une diminution de la division cellulaire. Nous avons tracé la proportion de cellules présentant une localisation nucléaire de Whi5 en fonction du taux de croissance de la population, et remarquons une anti-corrélation presque parfaite de ces deux quantités (Figure 24). Ce que nous ignorons à ce stade est si la diminution de croissance implique l'arrêt en G1, ou l'inverse. La transition G1/S est reliée à la dilution de l'inhibiteur Whi5 justement⁶ : en l'absence de croissance, cet inhibiteur pourrait par exemple ne pas être dilué, bloquant cinétiquement les cellules en G1.

Nous avons initié ce type de mesures chez la bactérie *E. coli*. Bien que les données restent pour l'instant qualitatives, nous observons une très grande différence : alors que la croissance semble rapidement diminuer, la division, elle, ne ralentit pas aussi vite. Cela implique que les cellules se divisent et deviennent de plus en plus petites. Contrairement aux eucaryotes, les bactéries ne semblent pas posséder pas de point de contrôle dans leur cycle qui pourraient coordonner la diminution de croissance à la diminution de division.

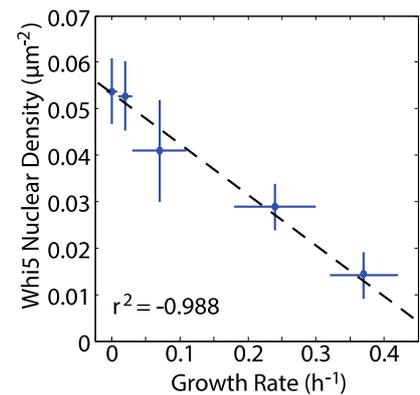


Figure 24 : L'accumulation de cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire, mesurée par la présence de la protéine Whi5 dans le noyau, est proportionnelle à la réduction du taux de croissance, chez *S. cerevisiae*.

Conclusions et Perspectives

Nous avons montré que l'encombrement impactait la production de protéines, et que sa réduction expliquait la réduction de la croissance observée sous confinement. Ce résultat est, à mon sens, assez fondamental : il relie une propriété intrinsèque des cellules, jusqu'ici sous-étudiée, à la croissance. Cette boucle de rétroaction, au-delà de son importance pour la réponse sous confinement, est également primordiale pour la croissance des cellules dans des conditions normales.

La manière dont l'encombrement régule la biosynthèse reste un mystère. Nous avons évoqué certaines pistes, comme la réduction de certains taux de productions (transcription ou traduction), ou encore un impact indirect sur certaines organelles comme le nucléole. Un point sur lequel nous allons concentrer nos efforts sur du court terme est le rôle de la séparation de phase liquide-liquide. Nous avons montré que l'encombrement intracellulaire pouvait moduler celle-ci³⁷. Le nucléole est une organelle issue de la séparation de phase. Des résultats préliminaires semblent impliquer d'autres organelles issues de cette séparation de phase, qui seraient les P-bodies. En effet, nous montrons que ces dernières se forment sous pression, et qu'elles semblent être impliquées dans la régulation de l'encombrement lorsque celui-ci est trop élevé. Nous pensons que de nombreuses régulations, directes (cinétiques de réaction) et indirectes (déclenchées par la pression / l'encombrement) coexistent dans les cellules pour s'assurer que ce paramètre crucial reste à une valeur bien déterminée. Nous ne nous attendons donc pas à trouver une voie de signalisation en particulier, mais de nombreuses voies qui œuvreraient ensemble à la régulation de l'encombrement, à différentes échelles de taille⁴⁶.

Nous avons commencé à étudier ces questions dans d'autres organismes, et poursuivrons les efforts dans cette direction, afin d'élucider une potentielle universalité de la réponse. Bien que nous pensions que les réponses indirectes (régulées) soient spécifiques à l'organisme, les réponses directes, basées sur des limites physiques, pourraient être communes. Nous essaierons de les identifier, pour unifier la réponse de différents organismes à la prolifération confinée.

La diminution de croissance s'accompagne d'une diminution de la division cellulaire. Celle-ci pourrait avoir des origines également liées à l'encombrement, ou pourrait être une conséquence de la limite de la croissance, les deux étant liés. Nous avons montré que les cellules eucaryotes s'accumulaient en G1, mais nous n'en savons pas plus. Nous avons initié une collaboration avec l'équipe d'A. Taddei pour étudier une potentielle mise en quiescence des cellules, et il semble en effet que ce soit le cas : des résultats préliminaires pointent vers une réorganisation de la chromatine et une hyperclusterisation des télomères, signe de quiescence chez *S. cerevisiae*.

D'autres phases du cycle pourraient être impactées. La phase de synthèse de l'ADN (phase S) sera étudiée, notamment en lien avec son initiation, afin d'observer si son entrée est possible lorsque l'encombrement est trop fort, ou si une synthèse sous fort encombrement ne peut pas impacter la réplication de certaines structures tertiaires stables de l'ADN. Nous allons également continuer nos études sur la mitose, afin d'étudier si les défauts durant cette phase peuvent facilement être réparés. Une mauvaise réplication / division de l'ADN peut être source d'instabilité génomique, très importante dans le cas du cancer. De plus, l'aneuploidie peut potentiellement désencombrer la cellule, ayant été associée à une signature de contrainte hypotonique et un abaissement de la viscosité cytoplasmique⁷². Ceci pourrait conférer un avantage prolifératif aux cellules sous pression : moins d'encombrement permettrait de limiter ses effets négatifs sur la prolifération.

Nous avons commencé des expériences montrant que certains mutants comme *SFPI1*, moins encombrés que la souche sauvage, proliféraient plus vite que celle-ci à pression de croissance égale (Figure 25a). Cette prolifération plus rapide fait que la souche mutante peut gagner une compétition pour l'espace sous pression (Figure 25b-c). Certaines mutations bien connues dans le cas du cancer du pancréas, comme la mutation activatrice de la protéine KRas, semblent aussi moduler l'encombrement (Figure 25d) : celle-ci, au-delà de ces effets spécifiques sur la prolifération, pourraient aussi procurer un avantage évolutif de croissance sous confinement. L'étude de la compétition cellulaire sous confinement fera partie, à court et moyen terme, des questions que nous étudierons.

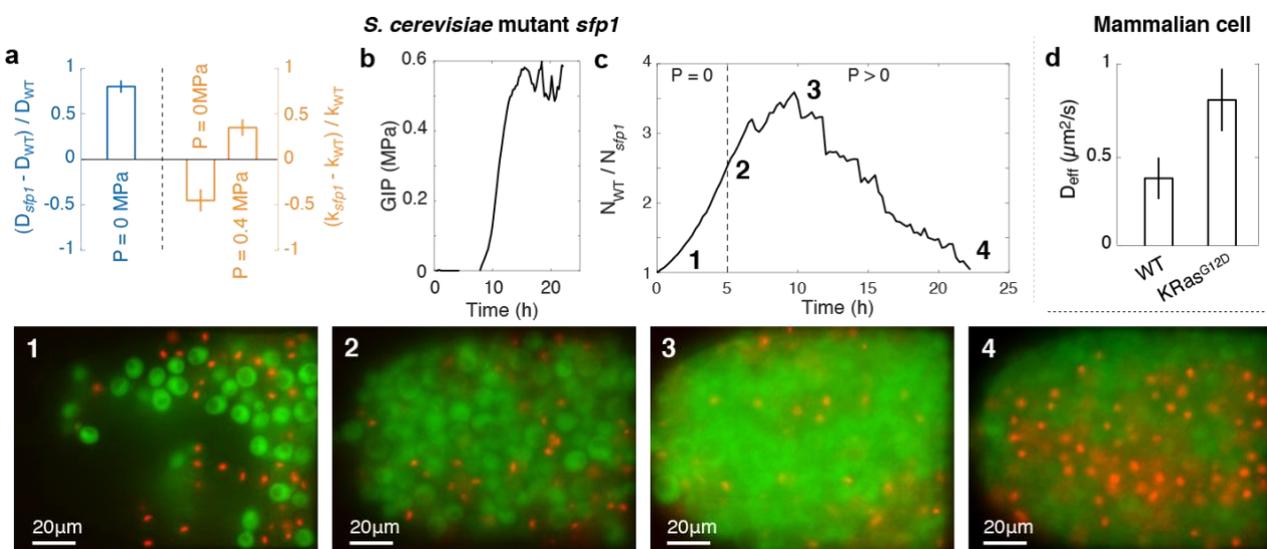


Figure 25 : Compétition entre différents génotypes. a. Une délétion du gène *SFPI1* amène à des cellules dont le cytoplasme est plus fluide, mais qui prolifèrent moins vite en croissance libre que la souche sauvage. La croissance confinée est en revanche accélérée. b. La pression de croissance est similaire à celle du sauvage. c. La différence de taux de prolifération fait que le mutant croît initialement moins vite et perd contre le sauvage, avant d'atteindre une prolifération plus élevée et finalement gagner. d. Une mutation activatrice de la protéine *KRas* amène à un cytoplasme plus fluide.

V. PRESSION DE CROISSANCE ET PATHOGENICITE : CAS DE LA CANDIDOSE ET DU CANCER

Encadrement sur cette partie :

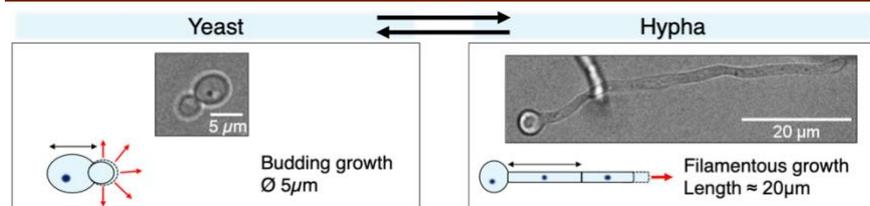
- Post-doctorants : Zacchari Ben Mériem, Mickaël Di Luoffo
- Ingénieur : Julien Faccini
- Etudiant.e.s en thèse : Lucie Albert, Tiphaine Matéo, Laure Le Blanc, Claire Lac, Sanzhar Aitbay, Ilaria Rizzuti

Nos études sur l'effet de la pression de croissance sont principalement fondamentales, et visent à comprendre comment cette contrainte mécanique, potentiellement ressentie par de nombreux organismes, peut les impacter, notamment d'un point de vue prolifératif. Dans de nombreux cas, la pression de croissance existe dans le cycle de développement de pathogènes ou de maladies. Cela est notamment le cas du cancer : les cellules sont capables de proliférer bien que confinées, et de développer des contraintes assez importantes. Ainsi, faire le lien entre nos études fondamentales et l'*in vivo* pourrait nous permettre de mieux comprendre cette maladie, et potentiellement mieux la diagnostiquer ou la traiter, en rajoutant une dimension mécanique⁷³.

Le cancer n'est pas la seule maladie pour laquelle la pression de croissance a un rôle. La croissance microbienne *in vivo* peut se faire dans des environnements élastiques / confinés. C'est par exemple le cas de la bactérie *N. meningitidis*⁷⁴ ou de la levure *C. albicans*⁷⁵. Leur croissance confinée pourrait impacter leur microenvironnement, ou directement leur physiologie. Bien que l'influence sur leur environnement pourrait être relié à des mécanismes immunitaires, comme l'exemple de la thigmo-immunité découverte dans l'interaction hôte-pathogène chez la plante⁷⁶, l'impact sur eux-mêmes pourrait participer à leur pathogénicité.

Une partie de nos études fait donc le pont entre le *in vitro* et le *in vivo*. Nous allons présenter un projet de recherche récent qui a trait à l'influence de la pression de croissance sur la levure commensale *C. albicans*, et pourrait être relié à sa pathogénicité. Nous allons ensuite présenter quelques applications que nous avons sur le cancer et son traitement, qui font l'objet d'une forte collaboration avec notre collègue J. Guillermet-Guibert du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse.

La pression de croissance déclenche la transition levure-hyphe chez *C. albicans*



Candida albicans est une levure commensale de la fleur intestinale humaine. Cette levure est dimorphique, pouvant réversiblement proliférer soit sous la forme « levure bourgeonnante », comme *S. cerevisiae*, avec des dimensions par ailleurs assez similaires, soit dans la forme « filamenteuse »,

Figure 26 : *Candida albicans* est une levure dimorphique, pouvant passer d'une croissance bourgeonnante (forme levure) à une croissance filamenteuse (forme hyphe), avec des filaments contenant plusieurs cellules qui peuvent atteindre plusieurs centaines de µm. Crédit : L. Albert.

formant de longs filaments poly-cellulaires appelés hyphes (Figure 26). Les deux formes sont importantes dans le cycle de vie de *C. albicans*, et sont notamment retrouvées dans les biofilms⁷⁷. De nombreux paramètres, comme notamment une inclusion en agarose, semblent favoriser l'émergence de la forme hyphe⁷⁸. Cette forme, et plus particulièrement la capacité de l'organisme à passer d'une forme à l'autre, semble avoir un impact sur sa virulence⁷⁹, qui est notamment motrice des candidoses, en forte augmentation les dernières années⁸⁰.

Nous nous sommes intéressés à *C. albicans* suite à notre découverte de la voie mécanosensible *SMuSh* chez *S. cerevisiae*²⁰, qui est conservée chez *C. albicans*, et semble dans son cas reliée à la transition levure vers hyphe⁸¹. Un potentiel confinement spatial dans les cryptes du tract gastro-intestinal pourrait être observée dans la transition commensal-pathogène⁸². Nous avons ainsi adapté nos dispositifs microfluidiques pour créer une chambre de « sortie » à l'arrière, et avons étudié l'effet du confinement spatial sur cette levure dimorphique. Nous avons montré, et de manière robuste, que le confinement spatial pouvait induire la transition levure-hyphe, observant de nombreux hyphes sortir de la chambre de confinement (Figure 27).

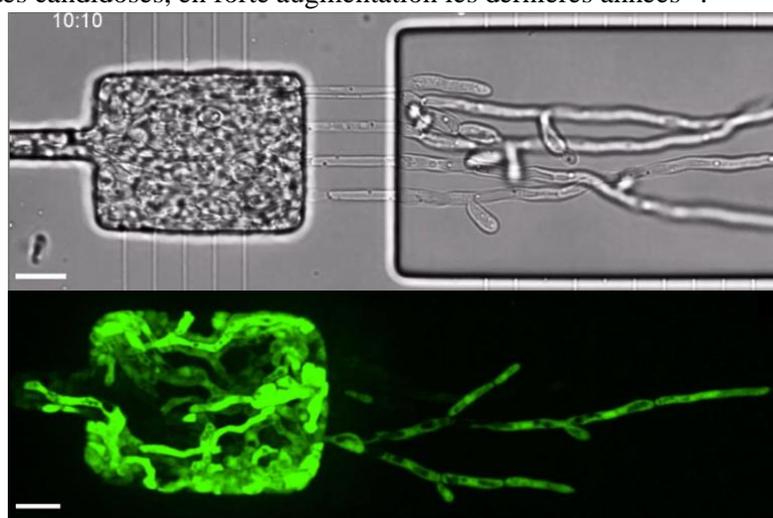


Figure 27 : Nous avons adapté nos dispositifs de compression de *S. cerevisiae* pour incorporer des canaux qui ne peuvent laisser passer que les hyphes. Nous remarquons que la pression de croissance déclenche la transition levure vers hyphes chez *C. albicans*. Un rapporteur fluorescent de l'activation montre que de nombreuses cellules peuvent s'activer, mais restent confinées. Crédit : L. Albert.

Notons que cette transformation s'effectue par ailleurs dans des conditions physico-chimiques normalement non transformatives pour les cellules (30°C, pH = 5.5), ce qui semble pointer vers un mécanisme fort d'induction. Comme nous pouvons l'observer sur la [Figure 27](#), les cellules qui sortent de la chambre confinée ne le sont plus elles-mêmes, mais persistent dans leur croissance sous forme d'hyphe : la transformation est robuste et conservée, sous la forme d'une mémoire cellulaire. De plus, nous observons des branchements qui s'effectuent sur le côté, mais qui ne sont pas des filaments : les divisions cellulaires, non confinées, s'effectuent quant à elles sous la forme levure, montrant la réversibilité du phénomène lorsque le confinement est levé.

L'étude en lumière blanche cache de possibles transformations dans la chambre de confinement, bien que nous puissions observer des hyphes en sortir. Nous avons choisi d'utiliser un rapporteur fluorescent de la transformation et de croissance sous forme d'hyphe, basée sur la protéine du mur sous forme hyphe *HWPI* : *P_{HWPI}-GFP*, exprimant de la GFP lorsque la cellule se transforme et active le promoteur de *HWPI*⁸³. Nous pouvons ainsi observer que des cellules se transforment également dans la chambre de culture ([Figure 27](#)).

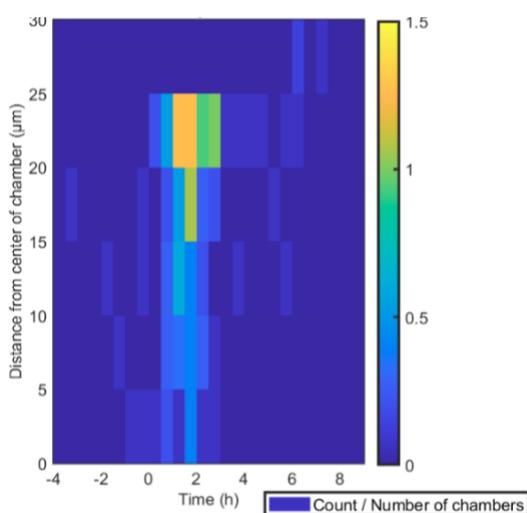


Figure 28 : Mesure spatio-temporelle du nombre moyen d'induction de la transition levure-hyphe sous confinement. Crédit : L. Albert.

concerne une molécule de détection du quorum, le farnesol, qui inhibe la transition levure vers hyphe⁸⁴. Un modèle simple de diffusion – convection – réaction en milieu poreux nous permet de montrer qu'il existe un gradient de concentration de farnesol, allant du centre vers le bord, et augmentant avec le temps par l'augmentation du nombre de cellules. Ce gradient structurerait spatialement l'activation du bord vers le centre, et inhiberait l'induction de nouvelles cellules lorsque le temps avance.

La croissance, la biosynthèse et la division sont également inhibés chez *C. albicans*

Une autre explication potentielle du ralentissement de la transition levure-hyphe serait l'arrêt progressif de la prolifération : sans prolifération, les cellules ne peuvent pas se transformer. L'avantage de la croissance sous forme hyphe de *C. albicans* est qu'elle permet une segmentation de la taille des cellules, ainsi que leur suivi. Nous avons segmenté les cellules et mesuré leur aire dans le temps, ainsi que la fluorescence du rapporteur. La [Figure 29a](#) montre l'exemple du suivi de

L'activation de la transition levure – hyphe est transitoire sous confinement

Nous avons utilisé le rapporteur de croissance sous forme hyphe, *P_{HWPI}-GFP*, pour quantifier temporellement et spatialement les cellules qui se transforment ([Figure 28](#)). Le temps « t = 0 h » correspond au moment de la confluence, et donc du confinement effectif des cellules. La position « 0 μm » correspond au centre de la chambre, et « 25 μm » à son bord lorsque celle-ci n'est pas encore déformée. Nous notons deux résultats importants :

1. L'induction de nouvelles levures en hyphes se passe principalement au bord de la chambre, dans les premiers 5-10 μm de celle-ci.
2. L'induction est temporellement contrainte, avec un temps d'induction moyen de 1.5h, et peu de nouvelles inductions passé ce pic.

L'origine exacte de cette structuration spatio-temporelle n'est pas encore totalement comprise. Notre hypothèse la plus forte

concerne une molécule de détection du quorum, le farnesol, qui inhibe la transition levure vers hyphe⁸⁴. Un modèle simple de diffusion – convection – réaction en milieu poreux nous permet de montrer qu'il existe un gradient de concentration de farnesol, allant du centre vers le bord, et augmentant avec le temps par l'augmentation du nombre de cellules. Ce gradient structurerait spatialement l'activation du bord vers le centre, et inhiberait l'induction de nouvelles cellules lorsque le temps avance.

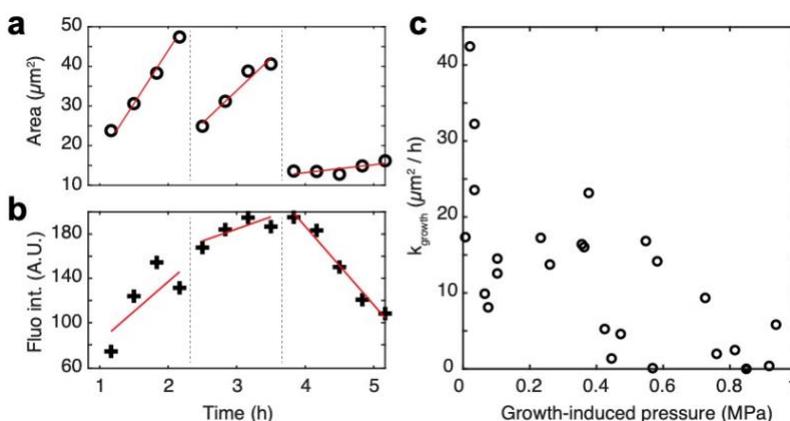


Figure 29. a. Croissance en aire des hyphes induites par le confinement. b. Intensité de fluorescence du rapporteur *P_{HWPI}-GFP* pour les mêmes cellules. Pour a et b, les lignes en pointillé indiquent la division de l'hyphe. c. Vitesse de croissance des hyphes sous confinement en fonction de la pression de croissance. Crédit : L. Albert.

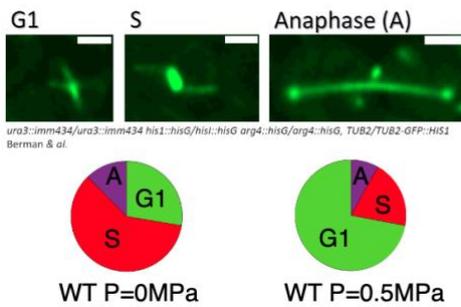


Figure 30 : La division cellulaire est inhibée chez *C. albicans* sous pression.

boulangier de contrôle de la biosynthèse par l'encombrement est également valide ici⁴⁰. En effet, nous aussi avons également induits les GEMs chez *C. albicans* et observons une diminution de leur diffusion sous pression (données non montrées). Nous remarquons en revanche que si la cellule ne croît pas, le rapporteur n'est plus induit, et que la fluorescence diminue progressivement, de par une probable dégradation de la GFP : ce promoteur n'est effectivement induit qu'en cas de croissance.

Pour terminer, nous avons utilisé un marquage des microtubules afin d'extraire, comme chez *S. cerevisiae*, la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire lors de croissance libre et lors de la croissance confinée. Nous remarquons que la diminution de croissance s'accompagne également d'une diminution de la division et d'une accumulation des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire (Figure 30). Ainsi, les conclusions tirées chez la levure du boulanger quant à la réduction de prolifération sont également valides chez ce pathogène, à la fois sous la forme levure et sous la forme hyphe, et pourraient participer à sa pathogénicité et à la transition levure vers hyphe. Le mécanisme exact de cette transition sous confinement n'est pas encore connu, mais pourrait donc être relié à sa virulence et / ou à la formation de biofilms.

Nous allons par la suite revenir sur l'effet délétère que pourrait avoir une réduction de prolifération sous pression de croissance lorsqu'il s'agit de traitement thérapeutique.

La réduction de prolifération sous pression limite l'efficacité d'agents thérapeutiques

J'ai choisi d'illustrer une conséquence de la limitation de prolifération due à la croissance confinée en termes de traitement de cancer. En effet, la croissance confinée induit l'émergence de pression de croissance. Il a été montré récemment que cette pression de croissance était suffisante pour clamper des capillaires sanguins²⁶, et que ceci pourrait impacter la délivrance de drogues : une hypo-perfusion pourrait limiter l'approvisionnement en petites molécules comme des agents chimiothérapeutiques. Dans une étude de 2012, Provenzano et ses collègues ont étudié l'effet d'un enzyme, la hyaluronidase, sur la pression de croissance et la taille des capillaires sanguins, et ont montré que celle-ci non seulement diminuait la pression mécanique, mais pouvait également augmenter le diamètre des capillaires, et donc augmenter la délivrance de drogues³². Pour appuyer leur propos, ils ont montré que l'effet de la gemcitabine, un agent habituellement utilisé dans le traitement du cancer du pancréas, avait une meilleure efficacité lorsque combinée avec la hyaluronidase. Mais ce résultat nous a troublé : si ce qui limitait l'efficacité de la drogue était

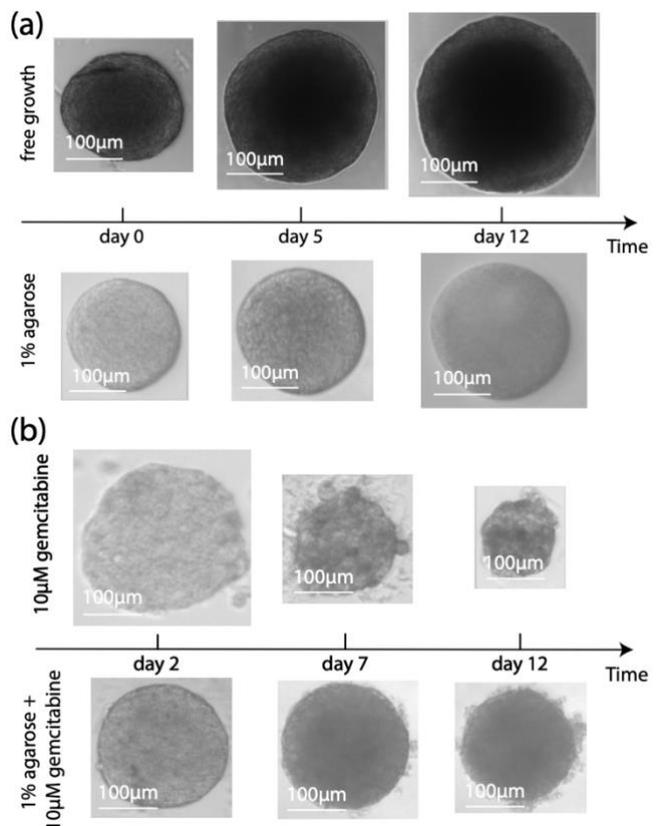


Figure 31. a. Croissance libre et confinée de sphéroïde multicellulaire. b. Effet de l'agent chimiothérapeutique gemcitabine sur un sphéroïde libre ou confinée.

l'accessibilité de la tumeur, la hyaluronidase ne devrait pas avoir une bien meilleure accessibilité que cette petite molécule.

Nous avons donc étudié une hypothèse alternative, à savoir, si la pression de croissance seule – dans le cas où la drogue était parfaitement accessible – peut impacter l'effet de l'agent chimiothérapeutique gemcitabine. En effet, la gemcitabine, un analogue de la cytosine, s'incorpore dans les cellules en train de synthétiser leur ADN (phase S du cycle cellulaire), et induisent une erreur irréversible amenant à la mort cellulaire⁸⁵. Or, pour fonctionner, cet agent a justement besoin que les cellules prolifèrent, ce qui n'est pas le cas sous confinement, et pourrait expliquer pourquoi la drogue, même si accessible, n'a pas d'effet.

Nous avons ainsi étudié l'influence de cet agent, à une concentration de 10 μ M, sur la croissance de sphéroïdes multicellulaires soit libres, soit confinés dans un gel d'agarose¹⁶. Nous observons que (i) le confinement

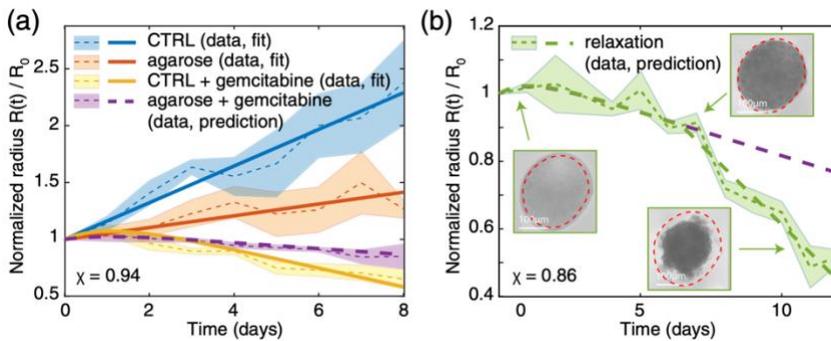


Figure 32. a. Rayon des sphéroïdes normalisés au rayon initial en fonction du temps pour différentes conditions de confinement / concentration de l'agent gemcitabine. Les courbes pleines correspondent à des ajustements de notre modèle, et la courbe en pointillé à une prédiction de celui-ci. b. Prédiction du modèle lorsque le sphéroïde est déconfiné : nous observons alors une accélération de l'effet de la gemcitabine.

diminution de prolifération sous pression. Comme nous ne pouvons pas explorer toutes les voies de signalisation potentiellement impliquées dans la résistance aux drogues, nous avons décidé de développer un modèle mathématique qui prédirait l'effet combiné de la drogue et de la pression de croissance si celle-ci ne jouait que sur la prolifération cellulaire : toute déviation de cette prédiction pointerait alors vers un mécanisme spécifiquement adaptatif. L'hypothèse de base de notre modèle est que l'agent chimiothérapeutique ne tue que les cellules qui prolifèrent, avec un taux de mortalité proportionnel au taux de division. Comme le taux de division ralentit sous pression, le taux de mortalité doit nécessairement diminuer. Le modèle est simple, et possède uniquement trois paramètres : 1/ le taux de prolifération libre, 2/ le taux de prolifération sous pression, et 3/ le facteur de proportionnalité entre taux de mortalité et taux de prolifération. Ces trois paramètres sont mesurables expérimentalement par l'ajustement d'un modèle de croissance simple aux données expérimentales libres et sous confinement, ou libre avec l'effet de l'agent seul. La Figure 32a montre à la fois le résultat des ajustements, ainsi que la prédiction de notre modèle considérant un taux de mortalité réduit par une prolifération plus faible sous confinement. Nous observons une excellente prédiction de notre modèle. Nous pouvons aller plus loin et tester l'impact de la relaxation du confinement, qui devrait alors accélérer l'effet de l'agent, par une ré-augmentation de la prolifération cellulaire (Figure 32b) : ici encore, notre modèle est excellentement prédictif.

En conclusion, la pression de croissance, en réduisant la prolifération cellulaire, limite l'efficacité d'agents chimiothérapeutiques qui ciblent justement les cellules qui prolifèrent. Ceci n'est pas uniquement vrai pour la gemcitabine, mais également pour d'autres drogues testées, comme le docetaxel, qui cible la phase M du cycle cellulaire¹⁶. Ainsi, un mécanisme d'origine physique et non relié à une quelconque voie de signalisation de résistance aux drogues peut expliquer une diminution de l'efficacité de certains traitements, et expliquer en partie les résultats de Provenzano et ses collègues³². Bien sûr, d'autres mécanismes liés au transport ou à une réponse biologique peuvent se superposer à notre mécanisme *in vivo*, mais celui-ci restera un point important à prendre en compte lors d'un traitement par chimiothérapie.

Vers des applications de traitement et de diagnostique dans le cancer

Les résultats que nous venons d'évoquer soulignent qu'il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes amenant à une limitation de la prolifération sous pression afin de pouvoir mieux traiter certains cancers ayant

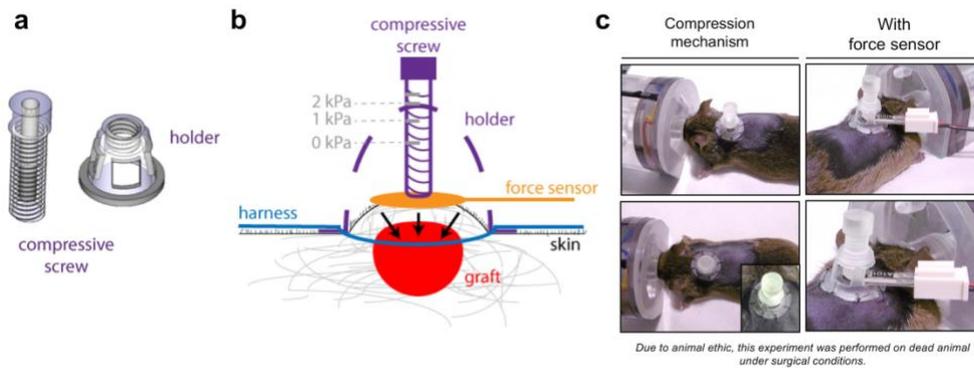


Figure 33 : Dispositif de compression *in vivo*. a-b. Schéma de principe et design d'un adaptateur permettant de comprimer une xéno greffe sous cutanée chez la souris. c. Positionnement du dispositif par un acte chirurgical léger.

une composante mécanique forte, comme le cancer du pancréas. Deux pistes orthogonales et complémentaires peuvent être envisagées : agir sur la sensibilité à la contrainte compressive, ou bien agir directement sur la composante mécanique, en la modulant à la hausse ou

à la baisse.

Dans le premier cas, il s'agit de comprendre pourquoi et comment les cellules s'accumulent en G1 sous contrainte compressive. Bien que la croissance puisse être ralentie pour des raisons principalement physiques. Comme présenté dans la partie précédente, des voies de signalisation sont peut-être activées pour contrer les limites physiques de l'encombrement. De même, l'arrêt en G1 et le contrôle du point de restriction, même si lié à l'encombrement, est très certainement relié à de la signalisation spécifique qui limite la division cellulaire, notamment par des protéines coordonnant croissance et division. La compréhension de ces mécanismes nous permettrait peut-être de pouvoir cibler précisément ces voies de signalisation afin de forcer les cellules à entrer dans le cycle, malgré la contrainte mécanique, ce qui pourrait augmenter l'efficacité d'agents chimiothérapeutiques. Cette recherche de cible pourrait être délicate et également connectée à l'inhibition de contact^{24,86,87}, et être commune à l'arrêt de prolifération des cellules « normales » : il faudra veiller à trouver des cibles spécifiques aux cellules cancéreuses, ou travailler à ne délivrer le traitement que dans les cellules cancéreuses.

Dans le second cas, moduler la contrainte mécanique s'avère également être une option intéressante. Les travaux utilisant la hyaluronidase vont déjà dans le sens d'une réduction de la contrainte mécanique, qui permettrait d'augmenter, par une renormalisation de la prolifération des cellules cancéreuses, l'efficacité des agents chimiothérapeutiques. Une autre piste pourrait être l'exacte opposé : comprimer davantage la tumeur. Ce type de traitement avait été envisagé par le passé, avant l'avènement des traitements chimiques et chirurgicaux, et avait été étudié par le clinicien Français J. Récamier⁸⁸. Puisque la compression limite la prolifération, peut-être que comprimer plus fort serait susceptible de contrôler la croissance de la tumeur, voire de la traiter si cette compression déclenche des voies apoptotiques³³. Dans son étude, Récamier avait montré que certaines tumeurs du sein pouvaient ainsi être traitées, bien que dans certains cas, la patiente mourrait plus vite. Ce dernier point pourrait être relié aux mutations spécifiques de la tumeur : selon leur génotype, certaines cellules deviendraient plus agressives, d'autres pourraient simplement arrêter de proliférer, et d'autres encore pourraient mourir. Nous avons initié des études visant à comprendre comment le génotype serait susceptible d'impacter des cellules soumises à une compression non seulement en termes de prolifération, mais également en termes de migration. Nous trouvons certaines conditions où, au lieu d'être diminuée, la prolifération sous pression est augmentée (peut-être de la même manière que le mutant *SFP1Δ* chez *S. cerevisiae* présenté dans le chapitre précédent), et où, selon le génotype, la migration cellulaire est quant à elle augmentée ou diminuée.

Ainsi, dans certains cas à déterminer, un traitement par compression pourrait être intéressant : nous avons initié ce genre d'approche chez la souris, en collaboration avec J. Guillermet-Guibert du CRCT, et avons développé un système de compression de xéno greffes afin d'étudier son effet *in vivo* (Figure 33). Ces travaux ne font que commencer, mais pourraient être une première brique vers l'utilisation des contraintes compressives comme traitement.

Conclusions et Perspectives

Les contraintes compressives issues d'une croissance confinée peuvent être expérimentées par de nombreuses cellules, et trouver des applications toutes particulières dans le cas de certaines pathologies, dont le cancer. Nous avons initié ces études, et avançons vers une meilleure prise en compte de ces effets dans le diagnostic

(imagerie et caractérisation mécanique) et le traitement (découverte de voies mécanosensibles et / ou utilisation de la mécanique directement). Notons que, dans le cancer, les effets des contraintes mécaniques ne se font pas ressentir que pour les cellules épithéliales, mais également pour les cellules stromales. Ainsi, une étude récente du groupe de D. Vignjevic montre que les fibroblastes activés semblent participer à la compression mécanique de tumeurs du colon²⁵. Nous travaillons en collaboration avec Christine Jean de l'équipe de C. Bousquet au CRCT afin de comprendre le rôle des contraintes compressives sur les cellules stromales, et montrons notamment qu'une compression semble pouvoir activer les fibroblastes : un dialogue mécanique entre cellules stromales et épithéliales pourrait ainsi se mettre en place pour, selon les cas, favoriser la progression tumorale, ou la restreindre.

D'autres thérapies plus récentes basées sur l'utilisation de virus sont en essais cliniques pour le traitement du cancer. Nous avons commencé à travailler avec l'équipe de P. Cordelier sur ces questions, afin d'étudier l'impact des contraintes mécaniques sur l'efficacité des virus, mais également sur leur capacité à pénétrer la tumeur. De manière générale, nous commençons à nous intéresser aux virus d'un point de vue encombrement : leur réplication intracellulaire doit nécessairement encombrer la cellule, et une partie de leur réponse apoptotique est peut-être reliée à l'encombrement^{89,90}.

Ces études nous permettent d'élargir nos envies de compréhension de l'impact de la pression et de sa variable intracellulaire, l'encombrement, sur la pathogénicité. Nos études sur *C. albicans* sont en ce sens assez fondamentales, et pointent vers une implication de la croissance confinée dans la virulence de cet organisme. Une fois le mécanisme amenant à la transition compris, nos études pourraient conduire à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter la candidose, maladie émergente du monde occidental^{80,91,92}.

Nous sommes convaincus que de nombreuses autres pathologies pourraient être reliées à des contraintes compressives et à de l'encombrement. Nous ne pouvons pas tout étudier, mais restons ouverts à ces questions, qui nous semblent être un champ d'application important de nos travaux de recherche. C'est ainsi le cas de l'infection par *N. meningitidis*, sur lequel nous travaillons en collaboration avec l'équipe de G. Dumenil de l'Institut Pasteur. De même, une meilleure compréhension des mécanismes de réponse aux contraintes compressives pourrait nous guider vers de nouvelles options thérapeutiques.

VI. CONCLUSIONS GENERALES

Tout au long de ce manuscrit, et à travers les quatre précédents chapitres, nous avons présenté des méthodologies permettant d'étudier le confinement spatial des cellules, la modulation de certaines de leurs propriétés physiques, et la manière dont ces modulations pouvaient impacter la prolifération cellulaire. Nous avons terminé par des applications dans le domaine du médical, en essayant de comprendre comment les contraintes mécaniques compressives pouvaient avoir un impact sur la pathogénicité de certains organismes.

Nos études se veulent les plus universelles possibles, avec pour but d'extraire des propriétés génériques de la réponse sous contrainte compressive. Nous comparons, à ces fins, les réponses de divers organismes, afin d'extraire de leur similitude ce qui pourrait être universel, et de comprendre de leur spécificité les différentes stratégies qui auraient pu évoluer afin de contourner les limites physiques inhérentes à la croissance confinée. Nous sommes convaincus qu'une potentielle réponse universelle pourrait émerger d'une réponse conservée des propriétés physiques.

Parmi celles-ci, nous pensons que l'encombrement macromoléculaire est une propriété clef des cellules, trop peu étudiée *in vivo*. Sa régulation, ainsi que la manière dont sa modulation peut être intégrée par des voies de signalisation, ne sont pas ou peu étudiées, et encore moins connues. Pourtant, lorsqu'il s'agit de l'intégration des contraintes compressives, le focus est pour l'instant principalement fait sur la surface cellulaire^{20,34,66,67}, avec un succès relatif lorsqu'il s'agit de comprendre comment cette intégration peut influencer sur la prolifération cellulaire. Étudier l'intégration de signaux compressifs non pas uniquement par la surface de la cellule mais également par son « intérieur » (Figure 34) peut ainsi représenter un changement de paradigme en mécano-biologie, et conduire à la découverte de nouvelles voies « encombrement-sensibles », essentielles à la prolifération, et plus particulièrement à la croissance cellulaire.

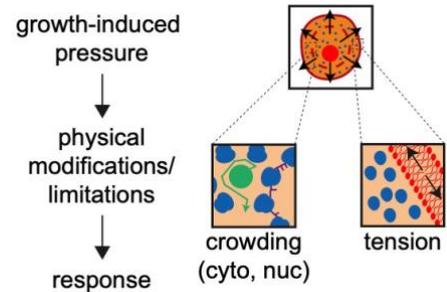


Figure 34 : La réponse à la pression de croissance peut avoir une origine surfacique, en jouant par exemple sur la tension de membrane, mais également une origine plus interne, en modulant l'encombrement macromoléculaire.

Dans toutes nos études, les approches théoriques ont un rôle central. La biologie est un univers fascinant avec une myriade de paramètres, certains indépendants, d'autres redondants, tous œuvrant au fonctionnement cellulaire. Des approches réductionnistes, avec un nombre limité de variables, permettent d'aller vers des modèles prédictifs. Même si chaque variable peut être influencée par de nombreux paramètres biologiques, un modèle prédictif permet de déterminer si, avec des hypothèses raisonnables, nous avons « compris » le système. Cette pensée est donc au centre des développements théoriques que nous effectuons : nous ne voulons pas un simple modèle qui décrit nos résultats, mais voulons tendre vers des modèles les prédisant. La bonne ou mauvaise prédiction de nos résultats peut alors nous renseigner sur la réponse biologique, les éléments à prendre en compte, ou encore les paramètres les plus sensibles. C'est ce que nous essayons de faire par exemple dans le cas de la prédiction de l'effet de la gemcitabine sous compression¹⁶, ou de l'impact de l'encombrement sur la prolifération et la génération de pression de croissance⁴⁰.

Ainsi, la combinaison de nos différentes approches en ingénierie, physique et biologie, avec des applications dans le domaine du médical, nous permettent d'étudier l'effet du confinement spatial sur la prolifération cellulaire, et les nombreuses questions accompagnant cet état. Ce sujet nous permet d'afficher notre originalité, avec de riches questions dans des domaines scientifiques variés, qui sont sources de multiples collaborations. Nous sommes persuadés qu'une meilleure compréhension de ces phénomènes nous permettra de mieux appréhender la prolifération cellulaire dans le vivant, et d'utiliser ce savoir pour mieux traiter certaines pathologies présentant des défauts de régulation de croissance.

VII. LITTÉRATURE CITÉE

1. Jorgensen P, Tyers M. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol.* 2004;14(23):R1014-27. doi:10.1016/j.cub.2004.11.027
2. Osella M, Nugent E, Cosentino Lagomarsino M. Concerted control of Escherichia coli cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(9):3431-3435. doi:10.1073/pnas.1313715111
3. Soifer I, Robert L, Amir A. *Single-Cell Analysis of Growth in Budding Yeast and Bacteria Reveals a Common Size Regulation Strategy.* Vol 26.; 2016. doi:10.1016/j.cub.2015.11.067
4. Son S, Tzur A, Weng Y, et al. Direct observation of mammalian cell growth and size regulation. *Nat Methods.* 2012;9(9):910-912. doi:10.1038/nmeth.2133
5. Turner JJ, Ewald JC, Skotheim JM. Cell size control in yeast. *Curr Biol.* 2012;22(9):R350-9. doi:10.1016/j.cub.2012.02.041
6. Schmoller KM, Turner JJ, Kõivomägi M, Skotheim JM. Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size. *Nature.* 2015;advance on. doi:10.1038/nature14908
7. Delarue M, Weissman D, Hallatschek O. A simple molecular mechanism explains multiple patterns of cell-size regulation. Polymenis M, ed. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182633. doi:10.1371/journal.pone.0182633
8. Charras G, Yap AS. Tensile Forces and Mechanotransduction at Cell–Cell Junctions. *Curr Biol.* 2018;28(8):445-457. doi:10.1016/j.cub.2018.02.003
9. Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, et al. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell.* 2017;171(6):1397-1410.e14. doi:10.1016/j.cell.2017.10.008
10. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-689.
11. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science (80-).* 1997;276(1425). doi:10.1126/science.276.5317.1425
12. Ingber DE. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. 2006;266:255-266. doi:10.1387/ijdb.052044di
13. Fernie AR, Zhang Y, Sampathkumar A. Cytoskeleton Architecture Regulates Glycolysis Coupling Cellular Metabolism to Mechanical Cues. *Trends Biochem Sci.* April 2020. doi:10.1016/j.tibs.2020.04.003
14. Fal K, Korsbo N, Alonso-Serra J, et al. Tissue folding at the organ–meristem boundary results in nuclear compression and chromatin compaction. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(8):e2017859118. doi:10.1073/pnas.2017859118
15. Breuil-Broyer S, Morel P, de Almeida-Engler J, Coustham V, Negrutiu I, Trehin C. High-resolution boundary analysis during *Arabidopsis thaliana* flower development. *Plant J.* 2004;38(1):182-192. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02026.x
16. Rizzuti I, Mascheroni P, Arcucci S, et al. Mechanical Control of Cell Proliferation Increases Resistance to Chemotherapeutic Agents. *Phys Rev Lett.* 2020;125(12):128103. <https://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.125.128103>.
17. Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, 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.* 2013;110(37):14843-14848.
18. Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol.* 1997;15(8):778-783. doi:10.1038/nbt0897-778
19. Delarue M, Hartung J, Schreck C, et al. Self-Driven Jamming in Growing Microbial Populations. *Nat Phys.* 2016;12(8):762-766. doi:10.1038/nphys3741
20. Delarue M, Poterewicz G, Hoxha O, et al. SCWISh network is essential for survival under mechanical pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(51):13465-13470. doi:10.1073/pnas.1711204114
21. Holt LJ, Hallatschek O, Delarue M. Mechano-chemostats to study the effects of compressive stress on yeast. *Methods Cell Biol.* 2018;147:215-231. doi:10.1016/bs.mcb.2018.06.010
22. Stewart P, Robertson C. Microbial growth in a fixed volume: studies with entrapped Escherichia coli.

Appl Microbiol Biotechnol. 1989;30(1):34-40. doi:10.1007/BF00255993

23. Chu EK, Kilic O, Cho H, Groisman A, Levchenko A. Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Nat Commun.* 2018;9(1):4087. doi:10.1038/s41467-018-06552-z
24. Streichan SJ, Hoerner CR, Schneidt T, Holzer D, Hufnagel L. Spatial constraints control cell proliferation in tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(15):5586-5591. doi:10.1073/pnas.1323016111
25. Barbazan J, Pérez-González C, Gómez-González M, et al. Cancer-associated fibroblasts actively compress cancer cells and modulate mechanotransduction. *bioRxiv.* April 2021:2021.04.05.438443. doi:10.1101/2021.04.05.438443
26. Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(38):15101-15108. doi:10.1073/pnas.1213353109
27. Nia HT, Liu H, Seano G, et al. Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology. *Nat Biomed Eng.* 2017;1(1):0004. doi:10.1038/s41551-016-0004
28. Nia HT, Datta M, Seano G, et al. In vivo compression and imaging in mouse brain to measure the effects of solid stress. *Nat Protoc.* 2020;15(8):2321-2340. doi:10.1038/s41596-020-0328-2
29. Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, et al. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(3):911-916. doi:10.1073/pnas.1118910109
30. Kalli M, Stylianopoulos T. Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Front Oncol.* 2018;8:55. doi:10.3389/fonc.2018.00055
31. GPF N, S A-G, F R, et al. Compromised nuclear envelope integrity drives TREX1-dependent DNA damage and tumor cell invasion. *Cell.* September 2021. doi:10.1016/J.CELL.2021.08.035
32. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 2012;21(3):418-429. doi:10.1016/j.ccr.2012.01.007
33. Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One.* 2009;4(2). doi:10.1371/journal.pone.0004632
34. Nam S, Gupta VK, Lee H, et al. Cell cycle progression in confining microenvironments is regulated by a growth-responsive TRPV4-PI3K/Akt-p27^{Kip1} signaling axis. *Sci Adv.* 2019;5(8):eaaw6171. doi:10.1126/sciadv.aaw6171
35. Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, 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.* 2013;110(37):14843-14848. doi:10.1073/pnas.1309482110
36. Narayanan J, Xiong J-Y, Liu X-Y. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *J Phys Conf Ser.* 2006;28(1):83-86. doi:10.1088/1742-6596/28/1/017
37. Delarue M, Brittingham GP, Pfeffer S, et al. mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding. *Cell.* 2018;174:1-12. doi:10.1016/j.cell.2018.05.042
38. Zhang Q, Li J, Nijjer J, et al. Morphogenesis and cell ordering in confined bacterial biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(31). doi:10.1073/PNAS.2107107118
39. Holt LJ, Hallatschek O, Delarue M. Mechano-chemostats to study the effects of compressive stress on yeast. *Methods Cell Biol.* 2018;147:215-231. doi:10.1016/bs.mcb.2018.06.010
40. Alric B, Formosa-Dague C, Dague E, Holt L, Delarue M. Macromolecular crowding limits growth under pressure. *Nat Phys.* November 2022. doi:10.1101/2021.06.04.446859
41. ETUDE DES MOYENS DE LITHOGRAPHIE HAUTE RESOLUTION POUR LA FABRICATION DE RESONATEURS A ONDES ELASTIQUES DE SURFACE : APPLICATION AUX SOURCES EMBARQUEES - TEL - Thèses en ligne. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00699511>. Accessed February 22, 2022.
42. Venzac B, Liu Y, Ferrante I, et al. Sliding walls: a new paradigm for fluidic actuation and protocol

- implementation in microfluidics. *Microsystems Nanoeng.* 2020;6(1):1-10. doi:10.1038/s41378-019-0125-7
43. Basan M, Risler T, Joanny J-F, Sastre-Garau X, Prost J. Homeostatic competition drives tumor growth and metastasis nucleation. *HFSP J.* 2009;3(4):265-272. doi:10.2976/1.3086732
 44. Suresh V, Alric B, Laborde A, et al. Microwell array based opto-electrochemical detections revealing co-adaptation of rheological properties and oxygen metabolism in budding yeast. *bioRxiv - Accepted Advanced Biosyst.* January 2021:2021.01.07.425712. doi:10.1101/2021.01.07.425712
 45. Rosato AD, Dybenko O, Horntrop DJ, Ratnaswamy V, Kondic L. Microstructure evolution in density relaxation by tapping. *Phys Rev E - Stat Nonlinear, Soft Matter Phys.* 2010;81(6):061301. doi:10.1103/PHYSREVE.81.061301/FIGURES/15/MEDIUM
 46. Persson LB, Ambati VS, Brandman O. Cellular Control of Viscosity Counters Changes in Temperature and Energy Availability. *Cell.* 2020;0(0). doi:10.1016/j.cell.2020.10.017
 47. Weber SC, Spakowitz AJ, Theriot JA. Nonthermal ATP-dependent fluctuations contribute to the in vivo motion of chromosomal loci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(19):7338-7343. doi:10.1073/pnas.1119505109
 48. Parry BR, Surovtsev IV, Cabeen MT, O'Hern CS, Dufresne ER, Jacobs-Wagner C. The Bacterial Cytoplasm Has Glass-like Properties and Is Fluidized by Metabolic Activity. *Cell.* 2014;156(1-2):183-194. doi:10.1016/j.cell.2013.11.028
 49. Ellis RJ. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(10):597-604.
 50. Vazquez A, Oltvai ZN. Macromolecular crowding explains overflow metabolism in cells. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep31007
 51. Tokuriki N. Protein folding by the effects of macromolecular crowding. *Protein Sci.* 2004;13(1):125-133. doi:10.1110/ps.03288104
 52. Miermont A, Waharte F, Hu S, et al. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(14):5725-5730. doi:10.1073/pnas.1215367110
 53. Molines AT, Lemièrre J, Edrington CH, et al. Physical properties of the cytoplasm modulate the rates of microtubule growth and shrinkage. *Dev Cell.* 2022:466-479. doi:10.1016/j.devcel.2022.02.001
 54. Xiang Y, Surovtsev I V., Chang Y, et al. Interconnecting solvent quality, transcription, and chromosome folding in *Escherichia coli*. *Cell.* 2021;184(14):3626-3642.e14. doi:10.1016/J.CELL.2021.05.037
 55. Szoradi T, Shu T, Kidiyoor GR, et al. nucGEMs probe the biophysical properties of the nucleoplasm. *bioRxiv.* November 2021:2021.11.18.469159. doi:10.1101/2021.11.18.469159
 56. Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol.* 2002;157(6):1071-1082. doi:10.1083/jcb.200202050
 57. Etoc F, Balloul E, Vicario C, et al. Non-specific interactions govern cytosolic diffusion of nanosized objects in mammalian cells. *Nat Mater* 2018 178. 2018;17(8):740-746. doi:10.1038/s41563-018-0120-7
 58. Wang B, Anthony SM, Bae SC, Granick S. Anomalous yet Brownian. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(36):15160-15164.
 59. Chaudhuri P, Berthier L, Kob W. Universal Nature of Particle Displacements close to Glass and Jamming Transitions. 2007. doi:10.1103/PhysRevLett.99.060604
 60. Chubynsky M V., Slater GW. Diffusing diffusivity: A model for anomalous, yet Brownian, diffusion. *Phys Rev Lett.* 2014;113(9):098302. doi:10.1103/PHYSREVLETT.113.098302/FIGURES/2/MEDIUM
 61. Cohen MH, Turnbull D. Molecular Transport in Liquids and Glasses. *J Chem Phys.* 1959;31(5):1164-1169. doi:10.1063/1.1730566
 62. Delarue M, Montel F, Caen O, et al. Mechanical Control of Cell flow in Multicellular Spheroids. *Phys Rev Lett.* 2013;110(13):138103.

63. Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny J-F, Cappello G. Compressive Stress Inhibits Proliferation in Tumor Spheroids through a Volume Limitation. *Biophys J*. 2014;107(8):1821-1828. doi:10.1016/j.bpj.2014.08.031
64. Dolega ME, Monnier S, Brunel B, Joanny J-F, Recho P, Cappello G. Extra-cellular matrix in multicellular aggregates acts as a pressure sensor controlling cell proliferation and motility. *Elife*. 2021;10. doi:10.7554/eLife.63258
65. Kafri M, Metzler-Raz E, Jonas F, Barkai N. Rethinking cell growth models. Nielsen J, ed. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(7):fow081. doi:10.1093/femsyr/fow081
66. Mishra R, van Drogen F, Dechant R, et al. Protein kinase C and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(51):13471-13476. doi:10.1073/pnas.1709079114
67. Neeli-Venkata R, Diaz CM, Celador R, Sanchez Y, Minc N. Detection of surface forces by the cell-wall mechanosensor Wsc1 in yeast. *Dev Cell*. October 2021. doi:10.1016/J.DEVCEL.2021.09.024
68. Ewald JC, Kuehne A, Zamboni N, Skotheim JM. The Yeast Cyclin-Dependent Kinase Routes Carbon Fluxes to Fuel Cell Cycle Progression. *Mol Cell*. 2016;62(4):532-545. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.017
69. Lancaster OM, Le Berre M, Dimitracopoulos A, et al. Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation. *Dev Cell*. 2013;25(3):270-283.
70. Qu Z, MacLellan WR, Weiss JN. Dynamics of the cell cycle: checkpoints, sizers, and timers. *Biophys J*. 2003;85(6):3600-3611. doi:10.1016/S0006-3495(03)74778-X
71. Johnson A, Skotheim JM. Start and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25(6):717-723.
72. Tsai HJ, Nelliath AR, Choudhury MI, et al. Hypo-osmotic-like stress underlies general cellular defects of aneuploidy. *Nature*. 2019;570(7759):117-121. doi:10.1038/s41586-019-1187-2
73. Haneveld GT. Compression as a treatment of cancer, a historical survey. *Arch Chir Neerl*. 1979;31(1):1-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/375837>. Accessed January 17, 2018.
74. Bonazzi D, Lo Schiavo V, Machata S, et al. Intermittent Pili-Mediated Forces Fluidize *Neisseria meningitidis* Aggregates Promoting Vascular Colonization. *Cell*. 2018;174(1):143-155.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.04.010
75. Arias F, Mata-Essayag S, Landaeta ME, et al. *Candida albicans* osteomyelitis: Case report and literature review. *Int J Infect Dis*. 2004;8(5):307-314. doi:10.1016/j.ijid.2003.12.006
76. Garcia F, Léger O, Vincent R, et al. Thigmoinmunity: mechanical signals prime the quantitative disease resistance of plant. - Institut National de Recherche en Agriculture, Alimentation et Environnement. 9. International Plant Biomechanics Conference. PlantBiomech 2018. <https://hal.inrae.fr/hal-02788093>. Published 2018. Accessed March 9, 2022.
77. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016;18(5):310. doi:10.1016/J.MICINF.2016.01.002
78. Brown Jr DH, Giusani AD, Chen X, Kumamoto CA. Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol*. 1999;34(4):651-662. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01619.x
79. Seman BG, Moore JL, Scherer AK, et al. Yeast and Filaments Have Specialized, Independent Activities in a Zebrafish Model of *Candida albicans* Infection. *Infect Immun*. 2018;86(10). doi:10.1128/IAI.00415-18
80. Morgan J. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep*. 2005;7(6):429-439. doi:10.1007/S11908-005-0044-7
81. Román E, Cottier F, Ernst JF, Pla J. Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(8):1235-1249. doi:10.1128/EC.00081-09
82. Kumamoto CA, Gresnigt MS, Hube B. The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. *Curr Opin Microbiol*. 2020;56:7-15. doi:10.1016/J.MIB.2020.05.006
83. Unoje O, Yang M, Lu Y, Su C, Liu H. Linking Sfl1 Regulation of Hyphal Development to Stress

Response Kinases in *Candida albicans*. *mSphere*. 2020;5(1). doi:10.1128/MSPHERE.00672-19/SUPPL_FILE/MSPHERE.00672-19-ST002.PDF

84. Polke M, Sprenger M, Scherlach K, et al. A functional link between hyphal maintenance and quorum sensing in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2017;103(4):595-617. doi:10.1111/mmi.13526
85. de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol*. 2014;741:8-16. doi:10.1016/J.EJPHAR.2014.07.041
86. Seluanov A, Hine C, Azpurua J, et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(46):19352-19357. doi:10.1073/pnas.0905252106
87. Puliafito A, Hufnagel L, Neveu P, et al. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(3):739-744. doi:10.1073/pnas.1007809109
88. Récamier JCA. *Recherches Sur Le Traitement Du Cancer, Vol. 1: Par La Compression Méthodique Simple Ou Combinée*. Gabon. Paris; 1829. https://books.google.fr/books/about/Recherches_sur_le_Traitement_du_Cancer_V.html?id=p3LJAQAACAAM&redir_esc=y. Accessed January 17, 2018.
89. Rana PS, Kurokawa M, Model MA. Evidence for macromolecular crowding as a direct apoptotic stimulus. *J Cell Sci*. 2020;133(9):jcs243931. doi:10.1242/jcs.243931
90. MA M, JE H, M K. Macromolecular Crowding: a Hidden Link Between Cell Volume and Everything Else. *Cell Physiol Biochem*. 2021;55(S1):25-40. doi:10.33594/000000319
91. Mora Carpio AL, Climaco A. *Candidiasis, Fungemia.*; 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28613783>. Accessed September 11, 2017.
92. Gupta R, Malik A, Rizvi M, Ahmed M. An alarming increase of fungal infections in intensive care unit: Challenges in the diagnosis and treatment. *J Appl Pharm Sci*. 2016;6(11):114-119. doi:10.7324/JAPS.2016.601118

VIII. ANNEXES

Curriculum vitae

Expérience de recherche

- Déc 2017 → **Chargé de recherche au CNRS**, LAAS-CNRS, Toulouse, France
- Juin 2016 – Déc 2017 **Post doctorat à New York University**, School of Medicine, NYC, USA
Encadrant : Pr. Liam Holt
- Jan 2014 – Juin 2016 **Post doctorat à University of California, Berkeley**, Berkeley, USA
Encadrant : Pr. O. Hallatschek
- Sept 2010 – Déc 2013 **Thèse à l'Institut Curie**, Paris, France
Encadrant : Dr. G. Cappello

Education

- 2013 **Thèse de physique**
UMR168, Institut Curie, Paris, France / Université Paris VII, Paris, France
Encadrant : Dr. Giovanni Cappello
- 2010 **Master 2 Interface Physiques-Biologie**
Université Paris XI/VII, Paris, France
- 2009 **Agrégation de physiques fondamentale**
Rang national : second
- 2006-2010 **Études de physiques fondamentales**
École Normale Supérieure Paris-Saclay (anciennement ENS Cachan)

Bourses et prix

- 2015 – 2016 **Bourse de post-doctorat**
Phillip Foundation
- 2014 **Prix des jeunes chercheurs dans les sciences de la vie**
Fondation Bettencourt-Schueller Fondation
- 2010 – 2013 **Bourse de thèse**
École Normale Supérieure

Communications scientifiques

Contributions orales sélectionnées à des conférences par des comités de lecture

GDR CellTiss, Paris (FR), 2011; Biophysical Meeting, Saarbruchen (DE), 2011 ; YRLS, Paris (FR), 2011; EMBO, Cargèse (FR), 2012; YRLS, Paris (FR), 2012; EMBO, Torino (IT), 2013; BPS, San Diego (US), 2014; Bio-X Symposium, Stanford (US), 2014; Gordon conference, Ventura (US), 2015; EMBO, Bad Staffelstein (DE), 2015; ASCB, San Francisco (US), 2016; CSH meeting, NY (US), 2017; BPS, San Francisco (US), 2018; MNF, Grenoble (FR), 2018, GDR CellTiss, Melun (FR), 2018

Orateur invité à des conférences internationales

- 2018 GDR ImaBio, Toulouse (FR); Yeast Imaging symposium, Toulouse (FR); Cell Biology and Cancer (FR), Paris; NanoBioTech, Montreux (CH)

- 2019 Mechanics of cell aggregates, Torino (IT); Mechanobiology Day, Toulouse (FR); News in Imaging, Toulouse (FR)
- 2020 Toulouse Oncoweeek, Toulouse (FR); Extracellular matrix and cancer, Toulouse (FR); 3D-Hub workshop (online)
- 2021 EMBO Cell size meeting Tel-Aviv (IS), TOR de France, Nice (FR)
- 2022 IFOM symposium, Milan (IT)
- 2023 EMBO meeting Endocytosis, Venice (IT)

Séminaires institutionnels

Invitation à présenter mes travaux dans divers instituts à Toulouse (FR – IMRCP, CBI, ITAV, CRCT), Lyon (FR – ILM), Paris (FR – Institut Curie, Institut Pasteur, Necker), New York (US – NYU).

Publications scientifiques

Les publications sont classées par année. **En vert** sont présentées les publications en tant que chercheur CNRS indépendant. [®] représente les contributions dont je suis auteur correspondant. Les pré-publications déposées sur Biorxiv sont également listées.

2022

- B. Alric, C. Formosa-Dague, E. Dague, L.J. Holt and **Delarue, Morgan[®]**. Macromolecular crowding limits growth under pressure. *Nature Physics* (2022).

2021

- T. Szoradi, T. Shu, ..., **M. Delarue** and Holt, Liam. nucGEMs probe the biophysical properties of the nucleoplasm. *Biorxiv* (2021).
- M. Di Luoffo, **M. Delarue** and Guillermet-Guibert, Julie. The biomechanical context influences the output signal, independently of PIK3CA signaling in breast cancer cells. *Biorxiv* (2021).
- Di-Luoffo, M, Ben-Meriem, Z, Lefebvre, P, **M. Delarue** and Guillermet-Guibert, Julie. PI3K functions as a hub in mechanotransduction. *Trends in biochemical sciences* (2021).
- Vajrala, V. S., B. Alric, A. Laborde, C. Colin, E. Suraniti, P. Temple-Boyer, S. Arbault, **M. Delarue[®]** and Launay, Jérôme. Microwell array-based opto-electrochemical detections revealing co-adaptation of rheological properties and oxygen metabolism in budding yeast. *Advanced biosystems* (2021).

2020

- Rizzuti, I. F., P. Mascheroni, S. Arcucci, Z. Ben-Mériem, A. Prunet, C. Barentin, C. Rivière, H. Delanoë-Ayari, H. Hatzikirou, J. Guillermet-Guibert and **Delarue, Morgan[®]**. Mechanical control of cell proliferation increases resistance to chemotherapeutic agents. *Physical review letter* (2020).

2019

- Holt, L. J., O. Hallatschek, and **Delarue, Morgan[®]**. Chapter 12 - Mechano-chemostats to study the effects of compressive stress on yeast. *Methods in cell biology* (2018).
- Delarue, Morgan, G. P. Brittingham, S. Pfeffer, I. V. Surovtsev, S. Pinglay, K. J. Kennedy, M. Schaffer et al. mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding. *Cell* (2018).

2017

- Delarue, Morgan[®], Gregory Poterewicz, Ori Hoxha, Jessica Choi, Wonjung Yoo, Jona Kayser, Liam Holt, and Oskar Hallatschek. SCWISH network is essential for survival under mechanical pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, no. 51 (2017): 13465-13470.
- Delarue, Morgan[®], Daniel Weissman, and Oskar Hallatschek. A simple molecular mechanism explains multiple patterns of cell-size regulation. *PloS one* 12, no. 8 (2017): e0182633.

- Bertillot, Fabien, Youmna Attieh, Morgan Delarue, Basile G. Gurchenkov, Stephanie Descroix, Danijela Matic Vignjevic, and Davide Ferraro. Microfluidic-Based Generation of 3D Collagen Spheres to Investigate Multicellular Spheroid Invasion. In *3D Cell Culture*, pp. 269-279. Humana Press, New York, NY, 2017.
- Dolega, M. E., Morgan Delarue, François Ingremeau, Jacques Prost, Antoine Delon, and Giovanni Cappello. Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nature communications* 8 (2017): 14056.

2016

- Delarue, Morgan, Jörn Hartung, Carl Schreck, Pawel Gniewek, Lucy Hu, Stephan Herminghaus, and Oskar Hallatschek. Self-driven jamming in growing microbial populations. *Nature physics* 12, no. 8 (2016): 762.
- Monnier, Sylvain, Morgan Delarue, Benjamin Brunel, Monika E. Dolega, Antoine Delon, and Giovanni Cappello. Effect of an osmotic stress on multicellular aggregates. *Methods* 94 (2016): 114-119.

2015

- Podewitz, Nils, M. Delarue, and J. Elgeti. Tissue homeostasis: A tensile state. *EPL (Europhysics Letters)* 109, no. 5 (2015): 58005.

2014

- Delarue, Morgan, Jean-François Joanny, Frank Jülicher, and Jacques Prost. Stress distributions and cell flows in a growing cell aggregate. *Interface focus* 4, no. 6 (2014): 20140033.
- Delarue, Morgan[®], Fabien Montel, Danijela Vignjevic, Jacques Prost, Jean-François Joanny, and Giovanni Cappello. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophysical journal* 107, no. 8 (2014): 1821-1828.

2013

- Delarue, Morgan, Fabien Montel, Ouriel Caen, Jens Elgeti, Jean-Michel Siaugue, Danijela Vignjevic, Jacques Prost, Jean-François Joanny, and Giovanni Cappello. Mechanical control of cell flow in multicellular spheroids. *Physical review letters* 110, no. 13 (2013): 138103.

2012

- Montel, Fabien, Morgan Delarue, Jens Elgeti, Danijela Vignjevic, Giovanni Cappello, and Jacques Prost. Isotropic stress reduces cell proliferation in tumor spheroids. *New Journal of Physics* 14, no. 5 (2012): 055008.

2011

- Montel, Fabien, Morgan Delarue, Jens Elgeti, Laurent Malaquin, Markus Basan, Thomas Risler, Bernard Cabane et al. Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Physical review letters* 107, no. 18 (2011): 188102.

2010

- Roquelet, Cyrielle, Jean-Sébastien Lauret, Valérie Alain-Rizzo, Christophe Voisin, Romain Fleurier, Morgan Delarue, Damien Garrot et al. II-Stacking Functionalization of Carbon Nanotubes through Micelle Swelling. *ChemPhysChem* 11, no. 8 (2010): 1667-1672.

Thèses, post-doctorats et stages encadrés

Depuis ma prise de fonction fin 2017, j'ai encadré et co-encadré 4 post doctorants, 8 étudiant.e.s en thèses, 2 ingénieur.e.s de recherche, et 10 étudiants de M2 – certains contrats sont encore en cours. Je détaille ci-dessous les encadrements des étudiant.e.s en thèse, des post-doctorants et des ingénieur.e.s de recherche.

Etudiant.e.s en thèse

- **Ilaria Rizzuti** (100% sur troisième année de thèse) – Ilaria nous a rejoint en 2018 d'Italie pour effectuer sa dernière année de thèse au sein de notre équipe. Elle a travaillé sur l'impact des contraintes mécaniques sur la résistance aux agents chimiothérapeutiques. Son travail à amener à la publication de Rizzuti *et al*, PRL, 2020.
- **Baptiste Alric** (100%) – Baptiste aura effectué sa thèse d'octobre 2018 à décembre 2021 sur une bourse ministérielle de l'UPS. Ses travaux portent sur l'étude de la sensibilité aux contraintes compressives sur les levures *S. cerevisiae*. Ses travaux, à la fois numériques et expérimentaux, auront amené à la publication de deux articles en premier / co-premier auteur, dont un dans *Nature Physics* en 2022.
- **Lucie Albert** (50%) – Lucie a démarré sa thèse en septembre 2019, sur une bourse 80'Primes du CNRS dont je suis co-porteur avec Catherine Villard. Sa thèse, à cheval entre le LAAS-CNRS et l'IPGG, portent sur l'étude de la sensibilité du pathogène *C. albicans* aux contraintes mécaniques. Elle aura été principalement réalisée au LAAS-CNRS.
- **Laure Le Blanc** (30%) – Laure a démarré sa thèse à l'Institut Pasteur en octobre 2019 sur fonds propres de l'équipe de Guillaume Dumenil. Elle est encadrée principalement par ce dernier et par D. Bonazzi, et effectue sa thèse à l'Institut Pasteur. Elle étudie l'impact des contraintes compressives sur le pathogène *N. meningitidis*. Dans ce cadre, elle effectue de nombreuses missions au LAAS-CNRS pour des développements technologiques.
- **Térence Desclaux** (50%) – Térence a démarré sa thèse en octobre 2020 sur une bourse ministérielle de l'INP. Il est encadré principalement par Olivier Liot de l'IMFT, où il effectue sa thèse. Cette dernière porte sur le bio-colmatage par la levure *S. cerevisiae*. J'apporte à la fois mon expertise pour cet organisme, ainsi qu'en microfabrication.
- **Tiphaine Matéo** (100%) – Tiphaine a démarré sa thèse en octobre 2020 sur une bourse ministérielle de l'UPS. Sa thèse porte sur le développement de nouveaux outils microfluidique pour étudier l'impact du confinement sur une population de cellules cancéreuses.
- **Claire Lac** (30%) – Claire a démarré sa thèse en octobre 2021 au CRCT sur une bourse ministérielle de l'UPS. Elle est encadrée principalement par Christine Jean. Cette thèse est la suite de son projet en tant qu'ingénieure de recherche, et a pour but de comprendre comment la compression d'un tissu sain peut participer à la propagation de signaux cancéreux.
- **Sanzhar Aitbay** (50%) – Sanzhar a démarré sa thèse en décembre 2021 au CRCT, sur une bourse européenne (ITN) obtenue par Julie Guillerment-Guibert. Sa thèse porte sur l'étude de l'intégration des contraintes compressives par la voie PI3K-Akt dans le cancer du pancréas.

Post-doctorants

- **Gabriel Lemercier** (100%) – Gabriel aura effectué son post-doctorat d'octobre 2018 à juin 2019, sur fonds propres. Son projet aura consisté au développement d'une puce microfluidique permettant d'effectuer, par électrochimie, des mesures d'activité métaboliques de cellules confinées.
- **Zacchari Ben-Mériem** (100%) – Zacchari aura effectué son post-doctorat de janvier 2018 à juin 2022, sur le contrat Press-Diag-Therapy de l'Inserm. Son travail aura permis le développement de nombreux outils

microfluidiques, ainsi que de mettre en évidence un couplage entre prolifération et motilité chez les cellules cancéreuses.

- **Mickaël Di-Luoffo** (100% puis 50%) – Mickaël aura démarré son post-doc au LAAS-CNRS en 2019 grâce à un contrat de la Fondation Toulouse Cancer Santé. Il est maintenant en post-doctorat dans l'équipe de Julie Guillermet-Guibert. Il travaille sur l'impact des contraintes compressives, à la fois *in vitro*, mais également *in vivo*, en étudiant en particulier l'effet d'une mutation sur le gène TP53.
- **Baptiste Alric** (100%) – Baptiste aura démarré son post-doctorat en janvier 2022 suite à sa thèse, sur un contrat de l'ANR, puis de l'ERC. Son court post-doctorat (un an) vise à étudier comment différentes mutations peuvent entrer en compétition mécanique pour l'espace.

Ingénieur.e.s de recherche

- **Claire Lac** (30%) – Claire aura travaillé de septembre 2019 à juin 2020 sur un poste d'IE, au CRCT, pour étudier comment les contraintes mécaniques compressives peuvent transformer un tissu sain en un tissu cancéreux.
- **Julien Faccini** (100%) – Julien a démarré son poste d'IE au sein du LAAS-CNRS en janvier 2022, sur un contrat de l'INCa. Le but de ses travaux sera de préparer diverses lignées de manière à réaliser un crible candidat sur l'intégration des contraintes compressives.

Enseignement

J'effectue depuis 2020 une mission d'enseignement au sein du M2 Physiopathologie. Nous organisons, en partenariat avec Laurent Malaquin et Julie Foncy, 12h de cours portant sur les contraintes mécaniques dans le vivant : quelles sont-elles ? Comment sont-elles intégrées ? Comment peut-on les reproduire pour mieux les étudier ? Ces parties de cours sont entièrement originales, et, pour les dernières, incluent notamment une visite du LAAS-CNRS et des démonstrations de mise en forme 3D.

Nous sommes de plus en train de développer un cursus de Bioingénierie avec Jenny Paupert (UPS) afin de pousser encore plus ces aspects, et avoir un volume d'enseignement qui nous permettra de réaliser des TPs sur ces différents aspects.

Organisation de conférences

Avril 2022	<i>Microphysio20'</i> – Conférence sur les systèmes microphysiologiques Conférence internationale, 100 participants, Cargèse, France (organisateur)
Sept. 2021	<i>Journées plénières du GDR Micro-Nano-Fluidique</i> Conférence internationale, 140 participants, Toulouse, France (co-organisateur)
Mai 2021	<i>Utilisation des organes-sur-puce pour le cancer</i> Workshop d'une demi-journée nationale, en ligne (co-organisateur)
Oct. 2020	<i>Microbes-on-chip</i> Workshop d'un jour international, 80 participants (co-organisateur)

Travaux d'expertise et jury de thèse

Expertise pour des RICL et agences de financement

2018 →	Rapporteur pour diverses organisations scientifiques (Wellcome Trust Foundation, Cancéropôle PACA and GSO, IDEX Paris). 1-2 rapports / an
2017 →	Rapporteur pour des RICL (tels que eLife, Phys. Rev. Lett, Phys. Rev. X, Sci Rep, Biophysical Journal, Biofabrication, etc.). 3-4 rapports / an

Participation à des jurys thèses

Février 2022	Examineur pour la thèse de Camille Courtine (IMRCP, Toulouse)
Février 2022	Rapporteur pour la thèse de Eléonore Vercruysse (Université de Mons, Mons, Belgique)

Contrats de recherche

Projets en cours

<i>Titre</i>	<i>Source</i>	<i>Total</i>	<i>Période</i>	<i>Rôle</i>
Elucidating the phenotypic convergence of proliferation reduction under growth-induced pressure	ERC Starting	1500 k€	2022-2027	porteur
Mechanical and molecular characterization of the impact of compressive stress on the progression and treatment of solid tumors	INCa PLBIO	520 k€	2021-2024	porteur
Compression-driven tumor evolution: from <i>in vitro</i> to <i>in vivo</i>	Inserm – Plan Cancer	523 k€	2021-2024	porteur

Projets passés

<i>Titre</i>	<i>Source</i>	<i>Total</i>	<i>Période</i>	<i>Rôle</i>
Universal impact of mechanical compression on cell growth	ANR JCJC	330 k€	2021-2022	porteur – arrêté en avril 2022, incompatible ERC Starting
Impact of compression on stromal induction in PDAC	Inserm – Plan Cancer	60 k€	2019-2021	coordinateur
Impact of mechanical stress on hyphal transformation in <i>C. albicans</i>	CNRS – 80' primes	170 k€	2019-2022	co-porteur
Study of compressive stress for diagnosis and therapy	Inserm – Plan Cancer	443 k€	2018-2021	porteur
Study of mechano-chemical coupling during cancer progression	Fondation FACE	20 k\$	2018-2021	co-porteur
Impact of mechanical stress in the mechanisms of drug resistance	Fondation Toulouse Cancer Santé	120 k€	2018-2021	porteur
Development of a microfluidic platform to study mechano-chemical coupling	Cancéropôle GSO	20k€	2018-2020	porteur

Animation et responsabilités institutionnelles

2021 →	Membre élu du conseil de laboratoire du LAAS-CNRS
2020 →	Co-animateur de l'Axe Stratégique Transverse Applicatif « Santé, Vivant, Environnement » du LAAS-CNRS (le but est de représenter ces champs disciplinaires à l'extérieur du LAAS-CNRS et de favoriser au sein du laboratoire

et à l'extérieur les interactions multidisciplinaires)

- 2019 → ***Membre du comité de pilotage*** de l'axe « Technologie pour la Santé » du Cancéropôle Grand Sud-Ouest (expertise et allocation de bourses, organisation d'événements scientifiques)
- 2019 → ***Membre du comité de pilotage*** de la plateforme de Caractérisation du LAAS-CNRS (allocation de budget)
- 2019 → ***Membre du comité scientifique*** du GDR « Micro- Nano-Fluidique », pour l'axe « Microfluidique pour le vivant »

Abstract

Français

La pression induite par la croissance émerge lorsqu'un organisme, quel qu'il soit, prolifère dans un environnement spatialement limité. La pression de croissance impose des limites physiques sur la physiologie cellulaire. Notamment, une réduction de la croissance et de la division est observée dans des organismes aussi éloignés d'un point de vue évolutif que des bactéries, des fongiques, des plantes ou des cellules mammifères. Cependant, certaines cellules sont capables de contourner ces limites physiques et de continuer à proliférer. C'est en particulier le cas des cellules cancéreuses, pour lesquelles la pression de croissance participe à la tumorigénèse et à la chimiorésistance. Malgré l'importance de cette contrainte, nous avons une connaissance très parcellaire des mécanismes d'intégration du signal lorsque les cellules prolifèrent en 3D sous une pression mécanique.

En particulier, nous ne savons pas si le contrôle mécanique de la prolifération a pour origine des voies de signalisation spécifiques ou s'il est une conséquence de la modulation des propriétés physiques des cellules. Nos activités de recherche interdisciplinaires ont pour but de comprendre la convergence phénotypique du contrôle mécanique de la prolifération sous confinement. Nous pensons qu'une grande fraction de la réponse est due aux limites physiques imposées par l'augmentation obligatoire d'une propriété clef de la cellule : l'encombrement macromoléculaire. Nous nous attendons à ce que l'encombrement limite des processus importants de la cellule associés à la croissance et à la division, et déclenchent des voies de signalisation spécifiques permettant de contourner ses limites.

Pour répondre à ces questions, nous développons des dispositifs microfluidique originaux pour étudier sur des bactéries, des cellules fongiques ou des cellules mammifères l'impact des forces compressives, et comment celles-ci peuvent physiquement limiter la croissance et la division. Nous nous focalisons principalement sur l'encombrement macromoléculaire, et étudions ses conséquences. Nous espérons utiliser ces connaissances pour mieux comprendre la pathogénicité de certains organismes, mais aussi proposer de nouvelles options thérapeutiques pour le cancer du pancréas.

Anglais

Growth-induced pressure necessarily emerges when a cell population, whichever the organism, proliferates in a 3D spatially-limited environment. Growth-induced pressure imposes physical constraints on cell physiology. A reduction of growth and division is observed in evolutionarily distant organisms such as bacteria, fungi, plants, or mammals. However, some cells are more capable of coping with these physical limitations and proliferate than others. This is in particular the case of cancer cells, for which growth-induced pressure participates in tumorigenesis and chemoresistance. Despite its importance, we are still at a loss to identify the basic sensing mechanisms associated with 3D proliferation under pressure.

It is notably unclear if the mechanical control of proliferation stems from specific signaling or is a consequence of associated changes in the physical properties of cells. Our interdisciplinary research activities aim elucidating the phenotypic convergence of the mechanical-control of cell proliferation. We believe that a large part of proliferation reduction comes from the physical limits imposed by the obligatory increase of macromolecular crowding under 3D confinement. We expect crowding to limit key processes associated with growth and division, and to elicit specific signaling essential to circumvent these limitations.

To this end, we develop unique microfluidic devices to investigate in bacteria, fungi, and mammalian cells how compressive forces physically limit growth and division and unravel the signaling pathways associated with the control of cell proliferation. We mainly focus on crowding, investigating its consequences. We intend on using this knowledge to understand and circumvent the pathogenicity of some organisms as well as offering novel treatment options for pancreatic cancer.