



HAL
open science

Biophysique de la croissance filamenteuse fongique et mécanique de perforation dans des élastomères

Nino Kukhaleishvili

► **To cite this version:**

Nino Kukhaleishvili. Biophysique de la croissance filamenteuse fongique et mécanique de perforation dans des élastomères. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ4095 . tel-03209516

HAL Id: tel-03209516

<https://theses.hal.science/tel-03209516>

Submitted on 27 Apr 2021

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.



$$\rho \left(\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \nabla v \right) = -\nabla p + \nabla \cdot T + f$$

$$e^{i\pi} + 1 = 0$$

THÈSE DE DOCTORAT

Biophysique de la croissance filamenteuse fongique et mécanique de perforation dans des élastomères

Nino Kukhaleishvili

Institut de Physique de Nice

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en physique
d'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Xavier Noblin
Martine Bassilana

Soutenue le : 17.12.2020

Devant le jury, composé de :

Pr Arezki Boudaoud, Rapporteur, Ladhyx, Ecole
Polytechnique

DR Catherine Villard, Rapportrice, Institut Pierre-Gilles
de Gennes pour la microfluidique

Pr Jacques Dumais, Examineur, Université A. Ibanez

DR Martine Bassilana, co-directrice de thèse, Institut
Biologie Valrose

CR Xavier Noblin, directeur de thèse, Institut de
Physique de Nice



*A toutes les filles, à tous les enfants,
qui n'ont pas l'accès à l'éducation*

Résumé

Les levures sont des champignons unicellulaires, qui peuvent être utiles (pain, bière) ou délétères pour l'homme. *Candida albicans* est une levure pathogène opportuniste de l'Homme, pouvant provoquer des infections superficielles mais aussi systémiques, pour lesquelles le pronostic vital est souvent engagé. Un des facteurs de virulence de cet organisme est sa capacité à transiter entre une forme ovoïde et une forme filamenteuse (hyphe), capable de pénétrer les tissus cellulaires. J'ai étudié pendant ma thèse la croissance d'hyphes de *C. albicans* (diamètre 2 microns environ) dans des élastomères de PDMS plus ou moins rigides. J'ai pu observer que ces hyphes sont capables de pénétrer de tels milieux aux rigidités comparables aux tissus humains. Mon travail s'est développé en deux parties.

Dans une première partie, j'ai étudié la pénétration dans du PDMS réticulé d'une tige macroscopique millimétrique pour mieux comprendre les mécanismes et forces en jeu, par analogie avec la perforation des hyphes de taille microscopique. J'ai mesuré les relations forces-déformation jusqu'au point où la tige ressort de l'échantillon de PDMS, ce qui constitue un aspect complètement original par rapport à l'état de l'art. J'ai pu montrer comment variait la force critique de rupture, mais aussi les forces résistantes à la pénétration jusqu'à la sortie de la tige, et quantifier les effets de la rigidité du PMDS, mais aussi de la vitesse.

Dans une deuxième partie, j'ai manipulé des souches de *C. albicans* sauvage et mutées. J'ai observé et mesuré leur croissance dans des dispositifs en PMDS microfabriqués à puits par imagerie en temps réel. J'ai d'abord réalisé un travail important de conception de ces dispositifs, sachant que la plupart des observations nécessitaient une distance de travail faible, ajoutant une contrainte forte sur la fabrication de ces dispositifs. La pénétration de milieux de rigidité et contrainte de rupture contrôlables imposent aux filaments des forces résistantes à leur croissance, au plus proche de la situation réelle, qui fait de l'approche proposée une démarche originale. Grâce aux résultats de la première partie, nous avons pu déterminer la pression de turgescence générée dans les hyphes en utilisant un modèle récent de croissance.

Mots clés : *Candida albicans*, Croissance invasive, Pression de turgescence, Forces de perforation, Indentation, PDMS,

Yeasts are unicellular fungi, which can be useful (bread, beer) or harmful to humans. *Candida albicans* is an opportunistic human pathogen, which can cause superficial as well as systemic infections, often life-threatening. One of the virulence factors of this organism is its ability to transit between an ovoid form and a filamentous form (hypha), capable of penetrating cellular tissues. During my thesis I studied the growth of *C. albicans* hyphae (diameter approximately 2 microns) in PDMS elastomers of various rigidity. I have observed that these hyphae are able to penetrate such environments with rigidities comparable to human tissues. My work was held into two parts.

On one hand, I examined the penetration in cross-linked PDMS of a macroscopic one-millimeter diameter probe to better understand the mechanisms and forces involved, by analogy with the perforation of hyphae of microscopic size. I measured the force-strain relationships up to the point where the probe protrudes from the PDMS sample, which is a completely original aspect compared to the state of the art. I was able to show how the critical breaking force varied, but also the forces resistant to penetration up to the exit of the probe and to quantify the effects of the rigidity of the PMDS, but also of the speed.

On the other hand, I worked with wild and mutated *C. albicans* strains. I developed and measured their growth in microfabricated PMDS membrane with chambers using real-time imaging. I first did a lot of work designing these membranes, most of the observations required a short working distance, which added a strong challenge on the manufacture of these membranes. The penetration of rigid media imposes on the filaments resistive stresses to their growth, as close as possible to the real situation. This makes the proposed approach an original one. Thanks to the results of the first part, we were able to determine the turgor pressure displayed in the hyphae using a recent growth model.

Keywords: *Candida albicans*, Invasive growth, Turgor pressure, Perforation forces, Indentation, PDMS

Avant-propos

« Dans la vie rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie

A ce moment d'écriture de thèse, une crise sanitaire s'abat sur la terre. L'épidémie d'un coronavirus dit « Covid-19 » a mis à l'arrêt le monde entier. Des symptômes très importants sont observés chez les malades, entraînant un nombre important de morts (plus d'un million de la population mondiale depuis le début de l'épidémie). Un confinement a été instauré dans de très nombreux pays dans l'attente de réponses. Ces réponses sont demandées à la science, aux chercheurs. Comment ce virus fonctionne ? Comment soigner les malades ? Est-il possible de développer un traitement et un vaccin ?

La Covid-19 résulte de l'hyper activité ou l'affaiblissement du système immunitaire, ce dernier mènent souvent aux infections fongiques et/ou bactériennes. Il est fort probable qu'une partie de décès de Covid-19 soit attribués à un pathogène opportuniste à l'infection virale, *Candida* (il est encore très tôt pour que cela soit quantifier). On parle de candidose pour nommer cette maladie infectieuse fongique. L'espèce pathogène est présente chez la plupart des êtres humains, mais, elle cause des infections chez les personnes immunodéficientes. Malheureusement, son mécanisme de virulence est peu connu pour l'instant et le taux de succès de guérison reste faible. Il semble évident qu'un grand nombre de décès aurait pu et pourrait être évité si des traitements efficaces contre les candidoses existaient. Il est donc essentiel de trouver des solutions aux infections fongiques. Outre les leçons que l'on pourra tirer sur le système sanitaire, sur la santé, l'économie, l'éducation, cette pandémie de Covid-19 pourrait encore un peu plus faire comprendre à la société l'importance de la recherche, la place de la science dans nos vies, dans la vie de notre écosystème.

Dans cette thèse, je me propose de vous présenter un membre de l'écosystème, *Candida albicans*, levure pathogène de l'humain avec une approche pluridisciplinaire. J'espère souligner l'importance de la recherche sur ce pathogène, et mettre en valeur la beauté de la complexité de mécanismes biologiques, biochimiques et tout particulièrement biophysiques. Je suis heureuse d'avoir rajouté une petite goutte d'eau dans l'océan et de partager avec vous le cas curieux de *Candida albicans*.

Il y a quatre ans, après avoir appris que les infections fongiques tuent environ 1,5 million de personnes par an et réalisé que les espèces de *Candida* représentent une menace microbienne mondiale et émergente, je me suis intéressée à ses propriétés biologiques et mécaniques. Ne pas savoir comment *C. albicans* envahit et pénètre dans l'hôte a stimulé ma curiosité. Je pensais que pour comprendre la pathogénicité de *C. albicans*, nous devons relier ses propriétés mécaniques à son activité biologique. C'est pourquoi j'ai participé à ce projet « Biophysique de la croissance fongique ».

L'objectif de ce projet interdisciplinaire était d'examiner la biophysique de la croissance filamenteuse de ce pathogène fongique humain. J'ai utilisé une combinaison de

micro-fabrication, de microscopie de cellules vivantes et de mesures physiques afin de comprendre comment *C. albicans* réagit et s'adapte en envahissant le substrat.

D'une part, durant ces années, j'ai dû comprendre et développer une méthode d'étude de la croissance fongique filamenteuse, qui est une croissance apicale et de sa biomécanique. D'autre part, j'ai dû surmonter des difficultés rencontrées en micro-fabrication, sur la mécanique des polymères et la culture cellulaire. Aborder des questions fondamentales en mécanobiologie fongique exigeait une approche interdisciplinaire et collaborative. J'ai investi toute ma passion, mes compétences et ma créativité dans ce projet, la biophysique de la croissance filamenteuse du pathogène fongique humain, afin de déterminer les relations quantitatives entre les forces physiques et la croissance cellulaire.

Le champignon *Candida albicans* est une levure commensale qui se trouve sur les surfaces muqueuses du tractus gastro-intestinal et urogénital chez la plupart des individus en bonne santé. Cependant, cet organisme peut provoquer des infections systémiques superficielles et potentiellement mortelles en réponse à des altérations de son environnement, et est particulièrement agressif chez les individus immunodéprimés. Un passage de la croissance bourgeonnante à la croissance filamenteuse est essentiel pour envahir les tissus de l'hôte, ainsi que pour éclater des macrophages de l'hôte.

La paroi cellulaire fongique peut se comporter comme un matériau élastique plus ou moins rigide mais aussi plus ou moins plastique en fonction de sa localisation dans l'épaisseur, la distance à la pointe, des échelles de temps et des contraintes en jeu. En effet, la paroi cellulaire doit être suffisamment solide pour résister à la pression de turgescence mais suffisamment extensible ou élastique pour se dilater. Les parois des cellules hyphales ont déjà été modélisées comme un matériau purement élastique, un matériau viscoplastique, mais aussi comme un fluide visqueux, mais la réalité est susceptible d'être quelque part entre ces extrêmes et les propriétés mécaniques de la paroi changent probablement en fonction de l'âge en raison de modifications chimiques. On pense que dans les hyphes, la paroi n'est accommodante (élastique) qu'à la pointe de croissance où la turgescence dépasse la résistance mécanique de la paroi cellulaire. Ce déséquilibre peut se traduire par une force exercée sur l'environnement extérieur. La déformation de la paroi cellulaire au cours de la croissance a été largement étudiée chez la levure (Bartnicki-Garcia et al. 2000 ; Abenza et al. 2015), dans les hyphes où l'étirement élastique dans la direction de la croissance est supérieur à celui de la direction perpendiculaire à la croissance. Cette déformation de la paroi cellulaire est cohérente avec la force motrice de l'expansion qui est la turgescence, mais un défi majeur consiste à séparer la contribution des propriétés de la paroi cellulaire de la pression de turgescence sous-jacente. En effet, les cellules à parois telles que les champignons sont fréquemment décrites comme une coquille fine, viscoélastique, gonflée par la pression de turgescence. Bien que les propriétés de la paroi cellulaire, en ce qui concerne la croissance et l'invasion du substrat, aient été largement étudiées chez les plantes et certains champignons, on sait peu de choses sur les hyphes de *C. albicans*.

On pense que la turgescence est une force motrice pour l'expansion des hyphes et est particulièrement critique pour la croissance invasive. Les mutants défectifs dans la génération du principal osmolyte fongique, le glycérol, présentent des défauts de déformation du

substrat dans la levure de fission modèle *S. pombe* et *C. albicans* (Minc et al., 2009). Dans les pathogènes fongiques, les liens entre la pression de turgescence et les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire sont largement inconnus. L'application récente de capteurs de force à cellule unique, utilisant des puits micro-fabriqués constitués d'élastomère, pour étudier *S. pombe* a considérablement facilité les mesures quantitatives de la mécanique cellulaire et de la croissance (Minc et al., 2009). En outre, cette méthode est compatible avec toute une gamme de techniques d'imagerie des cellules vivantes.

Lors de la croissance, de nouveaux matériaux s'ajoutent à la membrane plasmique et également à la paroi cellulaire. Compte tenu de l'ajout de nouveaux matériaux à la pointe des champignons en croissance, il est difficile de savoir à quel point la déformation élastique de la cellule est importante pour l'extension. La façon dont la synthèse de la paroi cellulaire est quantitativement liée à la croissance des hyphes est particulièrement intéressante en vue de la lutte contre les agents pathogènes fongiques tels que *C. albicans*. La vitesse de croissance du filament et la forme de la cellule dépendent à la fois du transport du matériau vers la pointe et du comportement mécanique de la paroi, qui peut lui-même être régulé par des processus cellulaires. Divers modèles ont été proposés pour décrire la biomécanique de ce processus, mais aucun n'a été étudié, ni testé, pour la croissance invasive de *C. albicans*.

Pour ce faire, j'ai développé un dispositif qui nous permet d'observer la croissance sous contrainte de *C. albicans*. Nous avons conclu que les micro-chambres, composées de polydiméthylsiloxane (PDMS) réticulé, un élastomère viscoélastique, étaient le meilleur compromis, en raison de sa non-toxicité, de son indice de réfraction et de sa large plage de rigidité. Pour déterminer les relations quantitatives entre les forces physiques et la croissance cellulaire, nous avons cultivé *C. albicans* dans des micro-chambres de rigidité différentes. Nous avons suivi l'invasion de *C. albicans* en fonction de la résistance du substrat, afin d'étudier la vitesse de croissance et la forme de la pointe. D'autre part, j'ai caractérisé, en mesurant la rigidité et la force résistive, chaque échantillon de PDMS utilisé sur *C. albicans*. J'ai par ailleurs imité l'invasion de *C. albicans* par indentation d'une sonde macroscopique dans le substrat, afin de comprendre le comportement à la rupture (fracture, frottement, adhésion) du PDMS. En combinant des observations microscopiques avec la loi de comportement force-déplacement à la rupture, j'ai pu quantifier la pression interne pour la souche sauvage, la souche sauvage traitée par un médicament antifongique et un mutant de la paroi cellulaire. J'ai également décidé d'aller plus loin dans la compréhension de la mécanique du PDMS. À cette fin, j'ai généré des échantillons de PDMS de rigidités différentes, mesuré leurs propriétés viscoélastiques et suivi de la force d'indentation tout en faisant varier plusieurs paramètres. Dans ce qui suit, vous trouverez :

- Dans le chapitre 1, l'état de l'art sur *Candida albicans* et le PDMS,
- Dans le chapitre 2, des informations détaillées sur la manière dont les expériences ont été menées (matériels et méthodes),
- Dans le chapitre 3, les résultats et la discussion sur les expériences d'indentation dans des blocs de PDMS.
- Dans le chapitre 4, les résultats et la discussion sur les expériences de croissance de *C. albicans* dans des systèmes à micro-puits déformables.
- Une conclusion générale, des annexes et la bibliographie.

Table des matières

Résumé.....	i
Avant-propos.....	iv
Table des matières	viii
1. Etat de l'art.....	1
1.1. <i>Candida albicans</i>	1
1.1.1. Champignon, <i>Candida albicans</i>	1
1.1.2. Paroi cellulaire.....	6
1.2. Biophysique de la croissance filamenteuse.....	12
1.2.1. Pression de turgescence.....	12
1.2.2. Propriétés mécaniques de la paroi cellulaire.....	19
1.2.3. Modèle de la croissance hyphale.....	28
1.3. Polydiméthylsiloxane (PDMS).....	30
1.3.1 Polymère	30
1.3.2 Propriétés mécaniques.....	34
2. Matériels et méthodes.....	44
2.1. <i>Candida albicans</i>	44
2.1.1. Culture cellulaire	44
2.1.2. Construction des souches	45
2.2. Dispositif.....	47
2.2.1. Photolithographie	47
2.2.2. Fabrication de la membrane en PDMS	50
2.3. Imagerie.....	56
2.3.1. Préparation de la membrane en PDMS	56
2.3.2. Traitement à la caspofungine.....	56
2.3.3. Microscopie.....	57
2.3.4. Analyse d'images.....	57
2.4. Caractérisation du PDMS.....	57
2.4.1. L'analyse mécanique dynamique.....	57
2.4.2. Indentation.....	59
3. Résultats et discussions PDMS.....	63
3.1. Propriétés du PMDS utilisé	63

3.1.1.	Module d'Young : viscoélasticité.....	63
3.1.2.	Module d'Young : effet du ratio PDMS:Réticulant.....	67
3.1.3.	Module d'Young : Effet du vieillissement et de la diffusion de l'eau	67
3.2.	Indentation	69
3.2.1.	Mécanique d'indentation.....	69
3.2.2.	Effet des conditions aux bords	69
3.2.3.	Comparaisons avec la théorie	71
3.2.4.	Effet du ratio PDMS : réticulant	75
3.2.5.	Effet de la vitesse d'indentation	77
3.3.	Perforation.....	78
3.3.1.	Exemples de perforations	78
3.3.2.	Décomposition de la force en forces clés	82
3.3.3.	Effet du ratio PDMS : Réticulant	84
3.3.4.	Effet des conditions aux bords	87
3.3.5.	Effet de la vitesse de déplacement de la sonde.....	89
3.3.6.	Effet de la géométrie de la sonde et de l'échantillon de PDMS	94
3.4.	Discussion	97
3.4.1.	Indentation.....	97
3.4.2.	Force critique.....	97
3.4.3.	Perforation	98
3.4.4.	Memento pour <i>C. albicans</i>	101
4.	Résultats et discussion <i>C. albicans</i>	103
4.1.	Changements de morphologie induits par la force mécanique	103
4.1.1.	Les modes de croissance en fonction de la rigidité du substrat	104
4.1.2.	L'effet de la force résistive sur la morphologie et l'extension de l'hyphe.....	108
4.1.3.	Pression de turgescence.....	120
4.2.	Croissance contre une force résistive de cellules avec un défaut de composition en β -1,3-glucane	124
4.2.1.	Mutant <i>rho1</i>	125
4.2.2.	Traitement à la caspofungine.....	128
	Conclusion générale	131
	Remerciements	134
	Bibliographie	141

Annexes - 1 -

1. Etat de l'art

1.1. *Candida albicans*

1.1.1. Champignon, *Candida albicans*

La place des champignons sur l'arbre phylogénétique

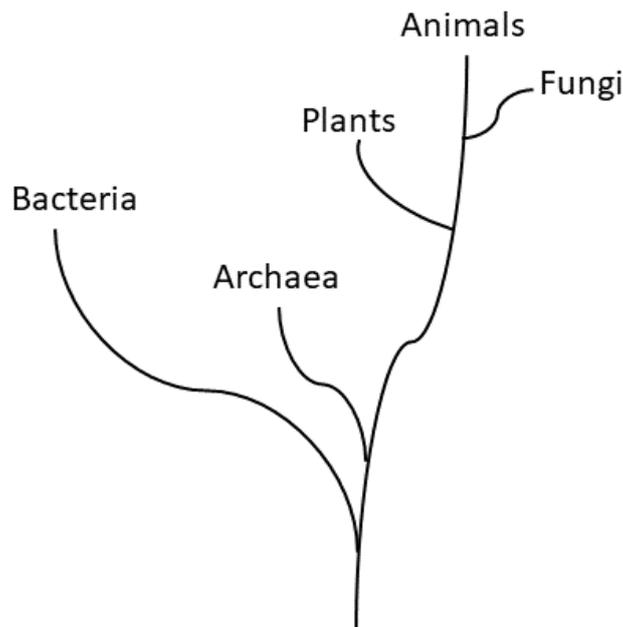


Figure 1.1 L'arbre phylogénétique

Le vivant, le règne Fungi et *C. albicans*. La classification phylogénétique permet de représenter des relations de parenté entre les êtres vivants. L'arbre phylogénétique se ramifie en trois domaines, Bacteria, Archaea et Eukaryota (Figure 1.1). Dans les Eukaryota parmi les cinq règnes se trouvent les champignons. Il faut noter que c'est un règne différent des plantes et des animaux, plus proche des animaux que des plantes, d'où la sévérité d'infection fongique chez l'Homme. On estime à cinq millions d'espèces de champignons, qui jouent un rôle important dans l'écosystème (Naranjo-Ortiz et Gabaldon, 2019). Ils sont omniprésents, par exemple aussi bien dans les glaciers antarctiques que dans la stratosphère, dans la mer morte, les sédiments océaniques mais aussi dans le tractus digestif de l'Homme (Figure 1.2). Les champignons sont utiles : on se nourrit de certaines espèces, ils servent également à la fermentation (bière, pain etc.). Par contre, d'autres espèces infectent les plantes, ce qui pose un problème pour l'industrie agroalimentaire, ou l'Homme chez qui ces infections peuvent être létales. Les champignons ont des caractéristiques communes : 1) la présence d'une paroi cellulaire, 2) ils sont unicellulaires ou pluricellulaires et croissent en mycélium (ensemble des filaments ramifiés, appelés hyphes). Leurs dispositifs de reproduction varient selon les espèces, ils peuvent présenter un pied et un chapeau pour les comestibles. Les champignons unicellulaires sont appelés des levures. Les levures ont une large variété de métabolisme, pour

des écologies très variées : consommation du méthanol, fermentation de xylose (sucre de bois), pathogène de l'humain, pathogène de la plante. On compte cinq modes de présence des levures chez l'hôte, commensalisme (survie bénéfique pour la levure, sans danger pour l'hôte), symbiose (survie mutuellement bénéfique), biotrophie (affaiblissant le système immunitaire de l'hôte), nécrotrophie (tuant les cellules hôtes pour se nourrir) et saprotrophie (se nourrir avec des cellules déjà mortes). Les champignons sont arrivés sur les continents en sortant des océans avec des plantes, chez qui ils étaient en symbiose (J. R. Kohler et al., 2017). Une même espèce de champignons peut être simultanément pathogène de plantes et de l'Homme, en revanche une même espèce ne peut vivre en symbiose chez les plantes et chez les animaux. Les caractéristiques évolutives des pathogènes sont : la perte des fonctions clés de métabolisme, l'augmentation de la thermophilie, l'augmentation de la capacité à former des biofilms, à développer une stratégie permettant l'invasion en formant des hyphes et permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Hittinger *et al.*, 2015 ; Kohler *et al.*, 2017).



Figure 1.2 Fungi collage

Dans le sens des aiguilles d'une montre : *Amanita muscaria*, Scarlet Elf Cap, Pain moisi, *Spizellomycete*, *Aspergillus fumigatus*.
(https://fr.wikipedia.org/wiki/Fungi#/media/Fichier:Fungi_collage.jpg)

Candida albicans est une levure commensale de l'Homme, qui est aussi un pathogène opportuniste. Cet organisme peut causer des infections des muqueuses, en général superficielles, mais également des infections systémiques, appelées candidoses invasives chez les personnes immunodéficientes. L'espèce *Candida albicans* appartient à la famille des *Candida*, à la classe Saccharomycotina, à laquelle appartient aussi la levure *Saccharomyces cerevisiae*, communément utilisée pour la fermentation de la bière ; ces deux espèces ont divergé il y a environ 840 millions d'années (McManus et Coleman, 2014). La classe

Saccharomycotina appartient au phylum Ascomycota, donc au groupe monophylétique (tous les membres descendent de la même espèce souche) Dikarya. Ce groupe est caractérisé par une vaste diversité d'espèces et est le groupe le mieux étudié. La plupart des espèces de ce groupe sont caractérisées par leur capacité à croître sous forme d'hyphes (croissance hautement polarisée), comme *Candida albicans*. Le phylum Ascomycota contient deux tiers de toutes les espèces fongiques, et compte tenu de cette diversité et de la facilité à manipuler certaines de ces espèces, c'est le phylum le mieux étudié, notamment pour des études d'évolution génétique. Ce phylum est composé de trois classes Taphrinomycotyna, Saccharomycotina et Pezizomycotina. Les 15000 (approximativement) espèces de la classe Saccharomycotina, qui s'organisent en quatorze familles, sont des commensales, vivant chez des hôtes comme les plantes ou l'Homme, la plupart d'entre elles sont des levures, ce qui est le cas de *Candida albicans*. Cette taxonomie est à présent acceptée, mais les études génétiques fournissent de nouvelles informations, qui rendent plus complexe la classification phylogénétique des levures, et il se peut que la place de certaines espèces, notamment celle de *Candida albicans* soit revue (Naranjo-Ortiz et Gabaldon, 2019).

Candida albicans, l'espèce pathogène

Pathogénicité. Que veut dire être pathogène de l'Homme ? Et à quel point une infection causée par *Candida albicans* est dangereuse ? Les espèces *Candida* sont la cause principale des infections fongiques. Parmi ces espèces, *C. albicans* est celle qui cause le plus d'infections (Butler *et al.*, 2009). Le taux de mortalité se situe entre 20% et 60% en fonction des facteurs aggravant du patient. Il est responsable d'environ 700 000 décès par an (Kornitzer, 2019). *C. albicans* peut infecter diverses niches physiologiques, la peau, la bouche, les tractus gastrointestinal et génito-urinaire. (Figure 1.3)



Figure 1.3 Candidose

Infection buccale due à *Candida albicans*. (<https://www.candidaalbicans.net/mycose-langue-buccale/>)

Cette levure est principalement décrite comme un commensal des mammifères, mais peut survivre sur les objets, comme les implants médicaux. Les mécanismes de dynamique de génomes, comme l'accumulation de mutations et la perte de l'hétérozygotie (présence de deux allèles différents sur un même locus d'ADN), permet à *C. albicans* de résister aux agents antifongiques et de s'adapter à l'hôte en infectant différentes niches (Ene *et al.*, 2019). Les

facteurs aggravants de la candidose sont l'immunosénescence (perte d'efficacité du système immunitaire lié à l'âge), la prise d'antibiotiques, les thérapies ou maladies immunosuppressives, les déficiences nutritionnelles et les dysfonctionnements endocriniens. Plus le patient est fragile, plus l'infection va être sévère, voire létale (Vila *et al.*, 2020). Il existe deux sortes de candidose, mucosale (biofilm à la surface et pénétration des cellules épithéliales) et invasive (pénétration dans les tissus profonds). Dans la plupart des cas, l'infection causée par *C. albicans* est endogène ; les cellules qui colonisent les tissus épithéliaux font une transition morphologique, pour former des hyphes qui prolifèrent et envahissent les tissus profonds de l'hôte. Ainsi, la forme levure ovoïde de *C. albicans* lui permet de se propager plus rapidement, et la forme filamenteuse hyphale est critique pour envahir les tissus épithéliaux. En plus de cette stratégie de changement morphologique, *C. albicans* secrète des enzymes, comme les lipases et protéases, pour fragiliser le tissu de l'hôte.

Morphogénèse. Un trait caractéristique de *C. albicans* est le fait qu'il puisse exister sous des morphologies différentes en fonction des conditions environnementales. Il peut se trouver en particulier sous forme de levures ovoïdes bourgeonnantes, de pseudohyphes (cellules allongées jointes les unes aux autres avec une division synchronisée), et d'hyphes (cellules à bords parallèles attachées les unes aux autres en croissance apicale ou en ramifications latérales) (Kadosh et Mundodi, 2020) (Figure 1.4). Les mutants incapables de générer des hyphes ou les mutants bloqués sous forme hyphale ne sont pas virulents (Hernandez-Chavez *et al.*, 2017) ; la forme levure bourgeonnante est importante pour la dissémination, et le filament hyphal permet l'invasion de l'épithélium. Les gènes essentiels à la croissance filamenteuse sont exprimés en même temps que des gènes associés à la virulence, ce qui permet par exemple la modification des propriétés de surface (Kadosh et Mundodi, 2020). La transition morphologique est ainsi associée à la virulence de *C. albicans*.

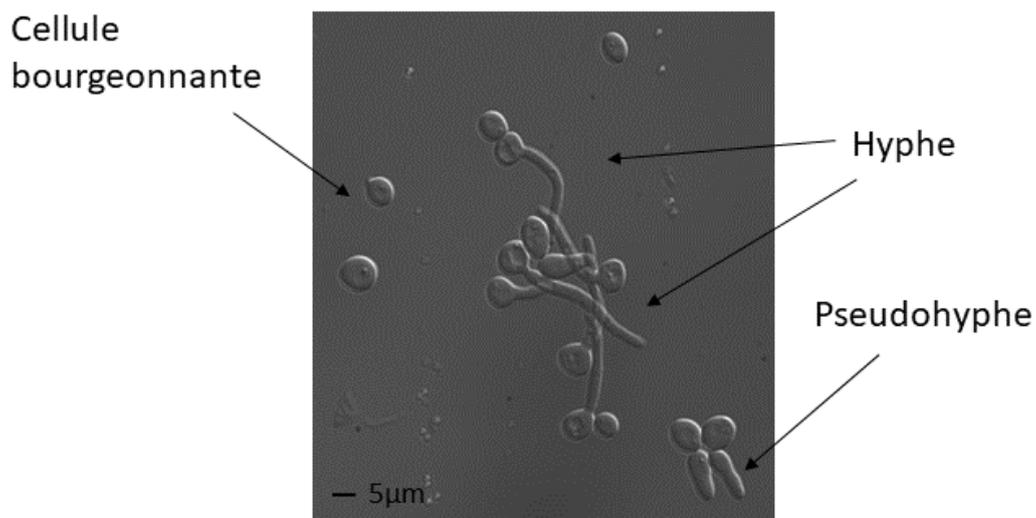


Figure 1.4 *Candida albicans*

Sur cette image prise en microscopie photonique, on observe des cellules bourgeonnantes ovoïdes de *Candida albicans*, des hyphes et pseudohyphes.

Initiation et maintien de la croissance. La transition morphologique se fait en deux étapes : 1) l'initiation de la croissance filamenteuse et 2) le maintien. Plusieurs voies de signalisation *via* des protéines assurent ces deux étapes (Basso *et al.*, 2018). La présence d'un facteur externe initie la croissance hyphale et domine sur la croissance induite par les facteurs internes, cette croissance est une réponse adaptative au stress (Basilana *et al.*, 2020). La transition morphologique de levure à hyphe peut être induite entre autres par la privation en nutriments, le sérum, la variation de pH ou de température, et le contact avec une surface. Par exemple, un pH neutre favorise la croissance filamenteuse, en dessous de pH 6 la croissance filamenteuse est réduite et à pH 4 c'est la forme de levure bourgeonnante qui prédomine. Le contact avec une surface déclenche des comportements comme le thigmotropisme (Kohler *et al.*, 2017) ou la formation de biofilm. La transition morphologique nécessite d'établir un site de croissance vers lequel s'oriente la réorganisation du cytosquelette d'actine et du trafic membranaire.

La croissance polarisée filamenteuse, pour être maintenue, nécessite l'apport de nouveau matériel à la membrane plasmique à l'apex du filament et le remodelage de la paroi cellulaire de *C. albicans*. La balance entre exocytose (qui permet la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique) et endocytose (qui permet le recyclage du matériel membranaire par invagination de la membrane plasmique) régule la croissance apicale. La vitesse de croissance du filament et la forme de la cellule dépendent à la fois de l'apport de matériel vers l'apex et du comportement mécanique de la paroi, qui peut elle-même être régulée par des processus cellulaires. Différents modèles ont été proposés pour décrire la biomécanique de ce processus (Caballero-Lima *et al.*, 2013), mais aucun n'a été étudié pour la croissance invasive de *C. albicans*. Une structure riche en vésicules de sécrétion à l'apex de l'hyphe, appelée Spitzenkörper et caractéristique des champignons filamenteux, est présente chez *C. albicans* (Weiner *et al.*, 2019). Il est proposé que cette structure est un centre d'approvisionnement en vésicules pour la croissance hyphale rapide. Un modèle mathématique de la croissance hyphale (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995) suggère que la forme de l'apex de l'hyphe dépend de la quantité de nouveau matériel de paroi cellulaire et de la vitesse de progression du Spitzenkörper (Riquelme, 2013). La croissance de la paroi cellulaire implique un équilibre complexe entre la synthèse des composants, qui constituent la paroi, et l'expansion mécanique. Il a été montré que la paroi cellulaire d'une hyphe croît orthogonalement à la surface du site de croissance, ce qui est cohérent avec une expansion de la paroi entraînée par la pression de turgescence (Bartnicki-Garcia *et al.*, 2000 *Biophysical Journal*).

Invasion

Endocytose et pénétration active. Il existe deux types d'infection, superficielle et invasive. Dans les deux cas, *C. albicans* doit résister au système immunitaire, lyser le tissu et être capable d'accéder aux tissus internes. C'est grâce à son métabolisme flexible, que *C. albicans* peut envahir aussi bien la surface des muqueuses que celles des organes, et qu'il s'adapte (Kohler *et al.*, 2017). *C. albicans* est invasif par pénétration active et passive. La pénétration active dépend directement de la croissance hyphale (Figure 1.5) et la pénétration passive se fait par le biais de l'endocytose par les cellules de l'hôte. La pénétration active

semble prévaloir lors de l'invasion des cellules épithéliales intestinales. L'invasion se fait en trois étapes, adhésion, croissance et dissémination. L'adhésion à la surface des cellules de l'hôte de *C. albicans* est établie par interactions électrostatiques (Vila et al., 2020) mais aussi par expression d'adhésines lors la croissance hyphale. De plus, pendant la croissance hyphale, *C. albicans* secrète des enzymes pour dégrader les tissus, en particulier la toxine *candidalysine* (Vila et al., 2020). L'invasion des cellules épithéliales résulte de la production de ces enzymes et toxines mais aussi des contraintes mécaniques développées lors de l'extension du filament.

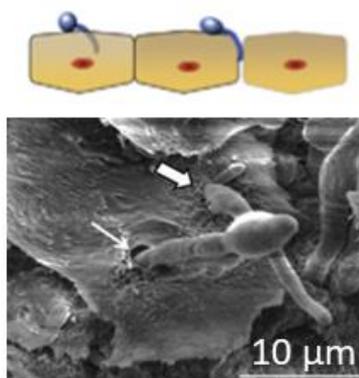


Figure 1.5 La pénétration active

Image de microscopie électronique de *Candida albicans* envahissant une cellule épithéliale. (Sheppard and Filler, 2014)

Le système immunitaire de l'Homme est capable de se défendre des pathogènes fongiques. Le système immunitaire reconnaît et phagocyte *C. albicans* sous forme levure. A l'intérieur du macrophage le taux de CO₂ plus élevé induit la croissance filamenteuse, et la force physique développée lors de l'extension de filament peut également permettre d'échapper aux cellules phagocytaires comme les macrophages (Hernandez-Chavez et al., 2017). *C. albicans* a développé des stratégies pour s'adapter, et manipuler le système immunitaire et même résister aux agents antifongiques grâce à la diversification génomique de sa population (Kohler et al., 2017).

1.1.2. Paroi cellulaire

Comme décrit dans la partie précédente, *C. albicans* réagit à l'environnement et s'adapte, ce qui peut résulter en des changements morphologiques mais aussi des altérations de la paroi cellulaire.

La composition et les caractéristiques de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire fongique est l'organe externe, qui protège la membrane plasmique et le compartiment cellulaire contre les chocs mécaniques, les stress environnementaux, et le système immunitaire de l'hôte. Elle est en contact direct avec l'environnement et joue donc un rôle important à l'interface entre la cellule et son environnement. La paroi cellulaire fongique est souvent considérée comme une enveloppe structurellement rigide qui définit la morphologie cellulaire, qui peut cependant s'adapter et changer de composition en fonction

de facteurs externes. En effet les gènes impliqués dans sa structuration sont régulés en fonction du pH, de l'hypoxie, de CO₂, des nutriments, la température et la présence d'agents antifongiques. Malgré sa résistance mécanique, la paroi cellulaire est une structure très dynamique et d'une grande plasticité, constamment remodelée. De fait, la paroi cellulaire est essentielle pour la survie, la morphogénèse et la pathogénicité fongiques ; cette structure est une des rares cibles pour la thérapie antifongique.

β-1,3-glucane, Chitine, Mannane. Dans le règne des champignons, la composition de la paroi cellulaire entre les espèces varie et chaque espèce a des caractéristiques uniques. La plupart des parois cellulaires fongiques ont une structure en couches, avec une couche constituée de longues chaînes de polysaccharides auxquels s'ajoute une variété de protéines, de lipides et d'autres composants, souvent spécifiques de l'espèce.

Les polysaccharides représentent 90% de la masse totale de la paroi cellulaire ; ils sont liés entre eux et créent une interphase forte, mais plastique, avec laquelle les champignons interagissent avec leur environnement. La paroi cellulaire de *C. albicans* est composée de trois principaux composants : (i) un squelette de chitine, (ii) un réseau de β-(1,3)- et β-(1,6)-glucane, et (iii) des protéines hautement glycosylées appelés mannoprotéines ou glycoprotéines (Cottier et Hall, 2020 ; Hernandez-Chavez *et al.*, 2017). La paroi cellulaire de *C. albicans* est organisée en deux couches, interne et externe ; elle est dynamique et sa composition varie selon les morphologies (Figure 1.6).

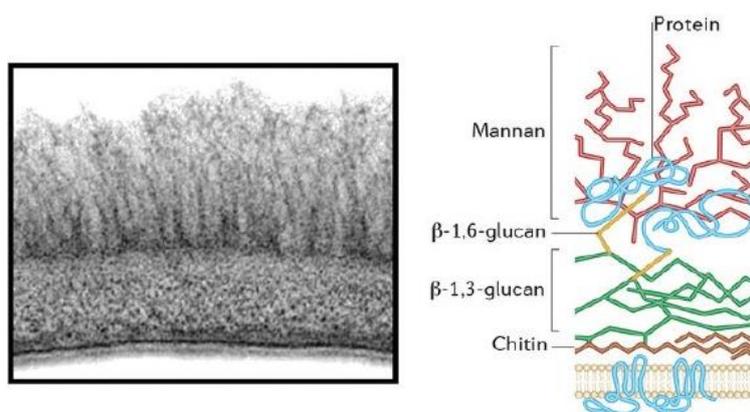


Figure 1.6 Composition de la paroi cellulaire de *Candida albicans*

A gauche une image de microscopie électronique à transmission d'une section de la paroi cellulaire de *C. albicans*, révélant des fibrilles de mannoprotéines dans la couche externe. A droite schéma de l'organisation structurale de la paroi. (Gow *et al.*, 2018)

La couche interne est composée d'un squelette de β-(1,3)- glucane, de β-(1,6)- glucane et de chitine (Roncero et Vazquez de Aldana, 2019) ; ces molécules fibrillaires forment une région dense, une structure essentielle qui entoure la membrane plasmique et qui est responsable de la résistance et de la forme de la paroi cellulaire (Hernandez-Chavez *et al.*, 2017). Cette couche joue donc un rôle de support mécanique et, par sa capacité à se remodeler en réponse au stress environnemental, elle assure une résistance aux forces de traction. Les glucanes sont les polysaccharides les plus importants et les plus abondants de la paroi cellulaire ; la délétion de gène responsable de la synthèse de glucanes sur l'un des allèles

affecte la croissance cellulaire, et la délétion des deux allèles est létale. Chez *C. albicans*, ils représentent 60% du poids total de la paroi cellulaire. Le β - (1,3) -glucane est le glucane le plus abondant, représentant 65% des β -glucanes (Roncero et Vazquez de Aldana, 2019), donc 40% de la paroi cellulaire (Hernandez-Chavez *et al.*, 2017). Les parois des cellules fongiques contiennent également une proportion plus faible de β - (1,6) –glucane, soit 20% chez *C. albicans*. Les β -1,6-glucanes sont des chaînes latérales de longueurs variables qui peuvent former des structures complexes stabilisées par liaisons hydrogène ; par des liaisons covalentes ils agissent comme une colle pour lier les molécules de β - (1,3) -glucane, chitine et les glycoprotéines (Hernandez-Chavez *et al.*, 2017). Le β -glucane est reconnu par le système immunitaire de l'hôte, produisant une réponse efficace contre l'infection, et par conséquent, le masquage du β -glucane chez *C. albicans* est un facteur critique. Les microfibrilles de la chitine sont stabilisées par des liaisons hydrogène avec une extrémité attachée au β - (1,3) -glucane, et l'autre extrémité libre (Roncero et Vazquez de Aldana, 2019), résultant en une résistance mécanique, associée à une insolubilité élevée. La teneur en chitine de la paroi fongique varie selon la morphologie du champignon. Elle représente 1 à 2% du poids de la paroi cellulaire de *C. albicans* sous forme bourgeonnante, mais peut atteindre jusqu'à 10–20% du poids de la paroi cellulaire de *C. albicans* sous forme filamenteuse. Même si la chitine est un composant mineur de la paroi cellulaire, elle est essentielle pour la survie cellulaire (Garcia-Rubio *et al.*, 2020), car elle joue un rôle important dans la division cellulaire et dans l'interaction avec l'hôte. Les souches mutantes déficientes en chitine sont moins virulentes, même si elles sont capables de coloniser des organes

La couche externe est composée de mannoprotéines, molécules hydrophobes et amorphes qui sont liées par des liaisons covalentes au squelette de β -glucane et de chitine (Hopke *et al.*, 2018). Cette couche est peu dense, principalement constituée de mannanes. Les protéines constituent 35 à 40% du poids de la paroi de *C. albicans* sous forme bourgeonnante, pour seulement 20 à 30% du poids de la paroi de *C. albicans* sous forme filamenteuse ; de plus, la structure des mannanes est différente entre morphotypes (Hernandez-Chavez *et al.*, 2017). Les mannanes sont réticulés aux β -1,6-glucanes, mais comme ils sont moins rigides que les β -glucanes et la chitine, ils n'influencent pas la forme des cellules. Ils ont de faibles perméabilités et porosité, ce qui permet de protéger la cellule contre différentes substances, tels des agents antifongiques et des cellules du système immunitaire de l'hôte (Gow et Hube, 2012). Les protéines de la paroi cellulaire ont différentes fonctions, d'adhésion, d'absorption de molécules, de transmission du signal, de synthèse et de réorganisation des composants de la paroi cellulaire. La couche de mannanes, qui couvre la couche interne de la paroi cellulaire en masquant les β -glucanes (Garcia-Rubio *et al.*, 2020), permet d'échapper à la détection immunitaire.

Elasticité et épaisseur. La paroi cellulaire est une structure dynamique et flexible aux propriétés viscoélastiques. Le volume vide entre les molécules de la paroi cellulaire représente 23 à 33% de son volume total, elle est donc poreuse, sa porosité étant déterminée par la couche externe de mannoprotéines. La taille des pores, $\sim 5,8$ nm est théoriquement trop petite pour permettre aux liposomes et aux vésicules de pénétrer librement la paroi cellulaire de *C. albicans*. Cependant, il a été observé que des liposomes peuvent traverser les couches de la paroi cellulaire de *C. albicans*, pour faire pénétrer des particules d'or de 15 nm de diamètre, bien que ces particules seules ne puissent pénétrer (Walker *et al.*, 2018). (Figure

1.7) Ces observations montrent que la paroi cellulaire est capable d'un remodelage rapide et que le trafic moléculaire à travers la paroi cellulaire fongique est régulé. Les propriétés viscoélastiques de la paroi cellulaire la rendent permissive aux vésicules et aux liposomes. Parmi les composants de la paroi cellulaire, seule la chitine a un effet significatif sur le trafic de liposomes. La paroi cellulaire est donc une structure de barrière poreuse mais dynamique, plutôt qu'une structure rigide à faible porosité (Walker *et al.*, 2018).

En réponse aux stress environnementaux, la paroi cellulaire adapte sa composition grâce aux voies de signalisation de stress évolutif et d'intégrité cellulaire. C'est un processus qui nécessite l'expression de gènes, donc du temps (Ene *et al.*, 2015). La question se pose donc de savoir comment *C. albicans* peut s'adapter à un stress soudain, tel qu'un choc osmotique par exemple. À la suite d'un choc osmotique on observe des changements volumétriques, conduisant souvent à une lyse (destruction) cellulaire, mais beaucoup de cellules survivent. Il a été observé que la paroi cellulaire suit la membrane plasmique qui rétrécit pendant le choc osmotique, ce qui suggère qu'elle est élastique. Cependant, on sait peu de choses sur la façon dont l'élasticité de la paroi cellulaire est régulée. Ene *et al.* (2015) ont montré qu'en bloquant les voies de signalisation de stress évolutif ou d'intégrité cellulaire, la survie cellulaire n'est pas affectée après un choc osmotique. En revanche, le degré de réticulation entre les polymères de la paroi cellulaire détermine la résistance au choc. La résistance élevée au stress est corrélée à une élasticité réduite de la paroi cellulaire, reflétée par des changements plus lents du volume cellulaire. Les changements et le réalignement structurel se produisent dans les secondes qui suivent un choc osmotique. Plusieurs facteurs semblent contribuer à l'élasticité de la paroi cellulaire de *C. albicans*, comme la conformation hélicoïdale des β -glucanes, glissement de polymères alignés localement les uns sur les autres et la famille d'enzymes Crh (Congo Red Hypersensitive) (Ene *et al.*, 2015). La paroi cellulaire est donc élastique et rigide.

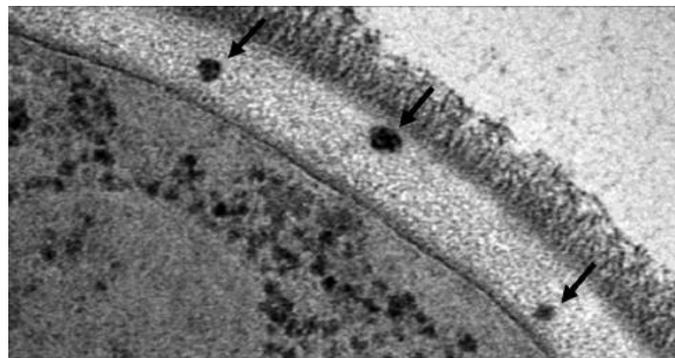


Figure 1.7 Accessibilité de la paroi cellulaire aux liposomes

Image par microscopie électronique de transmission de *C. albicans*, montrant des liposomes intacts dans la paroi interne de la cellule, indiquée par des flèches. (Walker *et al.*, 2018)

La modification de l'épaisseur permet d'adapter la rigidité de la paroi, les déformations élastiques étant limitées par la rigidité. On observe par microscopie électronique que pour la souche sauvage de *C. albicans*, l'épaisseur moyenne de la couche interne est de $77 \pm 15 \mu\text{m}$, et celle de la couche externe $76 \pm 17 \mu\text{m}$ (Walker *et al.*, 2018). L'épaisseur de la paroi cellulaire est comparable entre les différentes formes morphologiques. La paroi au site de croissance (à l'apex) est moins épaisse que le long du filament (Knafler *et al.*, 2019). L'épaisseur de la paroi cellulaire dépend de facteurs environnementaux tout autant que sa composition et sa

structure. L'épaisseur de la couche de mannanes dépend de la température, ainsi que celle de la couche interne ; plus la température est élevée, moins la couche de glucane et de chitine est épaisse (Cottier et Hall, 2020). Le pH a aussi un effet sur l'épaisseur, la croissance dans les milieux acides entraînant une réduction de 50% de la couche de mannanes, tandis que la couche interne n'est pas significativement affectée (Tableau 1.1) (Sherrington et al., 2017). Cependant, le pH alcalin a l'effet inverse, en augmentant l'épaisseur de la couche de mannanes. L'hypoxie réduit également l'épaisseur de la couche intérieure de 50%.

pH	Longueur des fibrilles de mannane
2	23,23 ± 3,58 nm
4	39,49 ± 4,61 nm
6	60,22 ± 10,73 nm

Tableau 1.1 Adaptation aux environnements acides des fibrilles de mannane (Donnée issue de Sherrington et al., 2017)

La quantification de l'épaisseur de la couche de paroi cellulaire externe a confirmé que l'adaptation aux environnements acides réduisait significativement la longueur des fibrilles de mannane.

Rôle et importance de la paroi cellulaire dans la pathogénicité de C. albicans

Virulence et résistance au système immunitaire. La paroi cellulaire joue un rôle important lors de l'interaction de la cellule fongique avec l'hôte, que cela soit pour l'invasion de tissus ou pour échapper aux cellules immunitaires. Elle interagit avec l'environnement extérieur par le biais d'adhésines qui sont essentielles pour l'invasion des tissus et protège contre les mécanismes défensifs de l'hôte. A sa surface, il y a un grand nombre de récepteurs qui, après activation, déclenchent des voies de signalisations complexes (Ditchtl *et al.*, 2016). Un pigment de la paroi cellulaire, la mélanine, qui est négativement chargé, hydrophobe et insoluble dans des solutions aqueuses, protège les champignons contre les facteurs de stress, tels des températures extrêmes, la lumière UV et les toxines, facilitant la survie dans l'hôte. La paroi cellulaire joue également un rôle important dans le contrôle de la perméabilité cellulaire (Walker *et al.*, 2018) et la protection contre le stress osmotique et mécanique (Ene *et al.*, 2015).

Les polysaccharides de la paroi cellulaire sont des motifs moléculaires associés aux pathogènes, PAMP (Pathogen-associated molecular pattern), reconnus par des cellules du système immunitaire exprimant des récepteurs PRR (Pattern recognition receptor). Ces polysaccharides peuvent être masqués par d'autres molécules, par exemple le mannane dans le cas de *C. albicans* (Hopke *et al.*, 2018). Il faut noter que les mannoprotéines sont elles-mêmes cibles des PRR (Cottier & Hall, 2020), et les cellules immunitaires peuvent reconnaître les mannanes, ce qui déclenche la phagocytose de *C. albicans*. Cependant, le taux de phagocytose est plus élevé quand les β -glucanes sont exposés (Cottier & Hall, 2020). Par

conséquent, au travers de la mannosylation et du taux d'exposition/masquage des glucanes, *C. albicans* peut réguler la production de cytokines pro-inflammatoires.

Alors que le β -glucane et le mannane sont des molécules uniquement pro-inflammatoires, la chitine peut en plus induire des réponses anti-inflammatoires (Cottier & Hall, 2020). Ceci serait fonction de la taille des particules de chitine, les plus grandes (40-70 μm) induiraient une réponse pro-inflammatoire et les plus petites (2-10 μm) une réponse anti-inflammatoire (Hernandez-Chavez *et al.*, 2017). La réponse anti-inflammatoire induite par la chitine pourrait être le résultat de la co-évolution de l'hôte et de *C. albicans* pour prévenir une nouvelle inflammation. Cependant, *C. albicans* profite de ce mécanisme pour réduire la réponse immunitaire (Cottier & Hall, 2020). Ainsi pour *C. albicans*, la paroi cellulaire est à la fois un modulateur immunologique et une cible thérapeutique.

Résistance aux produits antifongiques. Les composants de la paroi cellulaire fongique n'étant pas présents chez l'homme, cette structure est une excellente cible pour la thérapie antifongique (Perez-Nadales *et al.*, 2014). On distingue trois classes de traitements, les polyènes, les azoles (exemple, fluconazole) et les échinocandines (exemple, caspofungine). Le fluconazole est un agent fongistatique qui cible l'ergostérol présent dans la membrane plasmique, par conséquent il inhibe la croissance. Parmi ces agents, les échinocandines comme la caspofungine ciblent spécifiquement le β -1,3-glucane, composant majeur de la paroi cellulaire, mais la résistance augmente à ce traitement (Vila *et al.*, 2020 ; Garcia-Rubio *et al.*, 2020). Le médicament inhibe la synthèse du β -1,3-glucane par une inhibition non compétitive de l'enzyme β -1,3-glucane synthase. Le résultat final est une formation de paroi cellulaire fongique altérée qui peut entraîner une lyse osmotique, la mort cellulaire. L'activité fongicide des échinocandines contre la plupart des espèces *Candida* dépend de la concentration. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme le point auquel il y a une inhibition de 50% de la croissance par rapport au témoin. La morphologie des cellules de levure *C. albicans* cultivées en présence de 0,032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de caspofungine (représentant la 0.3*CMI typique), est illustrée à la Figure 1.8 (Walker *et al.*, 2009). La CMI de Caspofungin pour *Candida albicans* est 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Formosa *et al.*, 2013). La caspofungine a été le premier agent antifongique échinocandine à obtenir une licence d'utilisation (Song & Stevens, 2015).

L'inhibition de la synthèse de β -1,3-glucane par les échinocandines est assez efficace contre *C. albicans*, cependant cet organisme arrive à compenser ce déficit, en augmentant le taux de chitine dans la paroi cellulaire (Hopke *et al.*, 2018). Les souches ayant une concentration en chitine élevée sont plus résistantes à la caspofungine (Walker *et al.*, 2013). La résistance aux agents antifongiques est observée aussi bien en laboratoire qu'en clinique (Pristov et Ghannoum, 2019). Des facteurs connus pouvant contribuer à la résistance aux agents antifongiques sont en particulier la formation de biofilms, qui diminuent l'accessibilité à ces agents, la sélection de mutations, qui réduisent la sensibilité aux agents (Walker *et al.*, 2010), et la capacité d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte (Costa de Oliveira & Rodrigues, 2020). Il est urgent de mieux comprendre les mécanismes d'invasion et développer des nouveaux traitements pour soigner les infections fongiques (Robbins *et al.*, 2017).

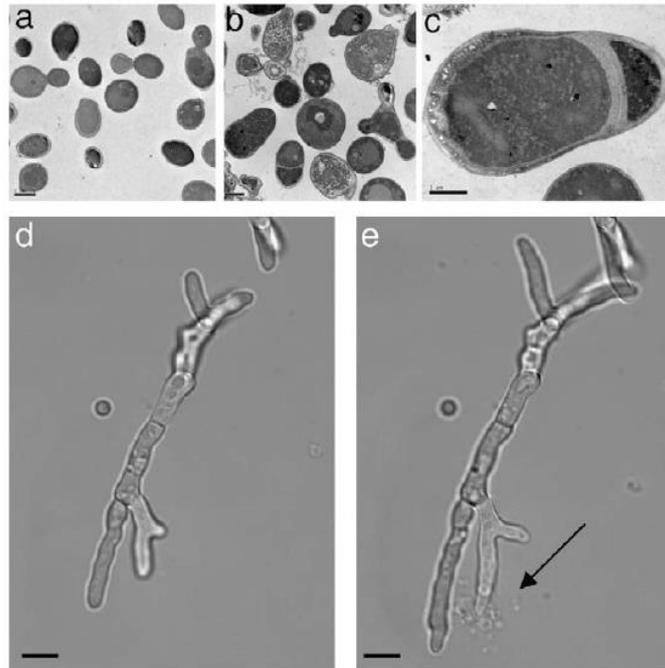


Figure 1.8 Traitement des cellules fongiques avec la caspofungine

Images de microscopie électronique à transmission de cellules de *Candida albicans* cultivées en milieu riche à 30°C pendant 6h en l'absence (a) ou en présence de 0,032 µg/ml de caspofungine (b) et (c). Les barres d'échelle représentent 2 µm en (a) et (b) et 1 µm en (c). Microscopie optique montrant des hyphes d'*Aspergillus fumigatus* après 13 h (d) et 14 h (e) de traitement avec 2 µg/ml de caspofungine, la lyse est indiquée par la flèche. En (d) et (e), la barre d'échelle est de 10 µm. (Walker et al., 2009)

1.2. Biophysique de la croissance filamenteuse

1.2.1. Pression de turgescence

Comment pousse une hyphe ? Actuellement, nous ne connaissons qu'une partie de la réponse. Les cellules à parois telles que les plantes, les algues et les champignons atteignent une croissance expansive en utilisant la pression de turgescence (résultant de la différence de pression) qui aide à atteindre la déformation irréversible des parois et régule leur forme et leur volume. Les cellules contrôlent leur taux et la direction de croissance grâce à la réorganisation du réseau, de l'architecture, de la paroi cellulaire et la pression de turgescence (Lew, 2011).

Dans cette section la pression de turgescence et les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire seront définies, et comment faire la distinction de leurs rôles respectifs dans la croissance sera discuté. La problématique de savoir si la croissance est régulée par la pression de turgescence ou par le trafic vésiculaire, sera également introduite. Les modèles de la croissance filamenteuse seront présentés.

Définition

La pression osmotique est la pression que l'on devrait imposer d'un côté d'une membrane semipermeable pour empêcher le flux de solvant généré par une différence de concentration de soluté, qui génère un gradient de potentiel chimique du solvant. Cette différence de concentration de soluté existe également entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule, par conséquent affecte la vie de tous les organismes, ce qui génère donc une pression osmotique à l'intérieur de cellule, appelé pression de turgescence, maintenue par homéostasie rapide. Cette pression met les parois cellulaires en tension et entraîne l'expansion cellulaire et joue le rôle de support mécanique (Beauzamy *et al.*, 2015). Certaines espèces de pathogènes fongiques utilisent leur pression interne pour pénétrer et coloniser des substrats solides. *Candida albicans* utilise également cette propriété pour l'invasion. (Money, 1995).

La loi de van't Hoff qui est analogue pour des solutés peu concentrés dans des solutions idéales à la loi du gaz parfait (l'équation de pression osmotique, dérivée à partir du potentiel chimique) : $\Pi V = nRT$, où Π est la pression osmotique, V le volume cellulaire, n le nombre de moles de solutés osmotiquement actifs, R est la constante de gaz et T est la température décrit la nature et le rôle de la turgescence dans l'expansion cellulaire (Lew, 2011). Dans une cellule en croissance, toutes ces propriétés changent. Par exemple, l'augmentation du volume diminue à la fois concentration de soluté (donnée par n/V) et pression osmotique, tandis que des augmentations de pression osmotique entraînent une augmentation du volume et, par conséquent, une diminution de la concentration de soluté.

Régulation de la turgescence. La concentration de soluté dans le milieu extracellulaire peut varier dramatiquement, les champignons peuvent donc subir des chocs osmotiques extrêmes, un stress hyper-osmotique ou choc hypo-osmotique. Ce dernier, qui correspond à une pression hydrostatique interne qui devient très élevée, résulterait en une rupture de la paroi cellulaire, c'est-à-dire la lyse cellulaire. Pour survivre et maintenir la croissance, les champignons doivent être capables d'ajuster les concentrations de solutés intracellulaires pour contrôler leur turgescence, ou ils doivent modifier l'extensibilité de la paroi cellulaire pour éviter la lyse (Lew, 2011).

Pression et volume. Lorsque la pression est augmentée, le volume d'une cellule aura tendance à augmenter, la valeur de cette augmentation dépend de la rigidité de la paroi cellulaire qui va plus ou moins résister à la déformation. En considérant le cas de la paroi cellulaire qui s'étire en changeant le volume cellulaire, l'équation définissant le volume cellulaire V peut être établie : $dP / dV = \varepsilon / V$, ε est un module volumique de la cellule, relié au module de la paroi et à la géométrie de la cellule (Lew, 2011). La variation de la pression et du volume dépend du volume initial et de l'élasticité de la paroi. D'autre part le module ε n'est pas une constante, il augmente avec la pression. Ainsi plus la pression est grande plus il est difficile de déformer une cellule. Cette élasticité de la paroi limite l'expansion du volume de la cellule, car la paroi cellulaire n'est plus capable de s'étirer du tout au-dessus d'un seuil de la pression de turgescence. La corrélation entre la turgescence et le volume cellulaire n'est donc pas linéaire.

Rôle de la pression de turgescence

La pression de turgescence, générée par la synthèse des osmolytes, facilite la croissance polarisée, mais aussi la pénétration de l'hôte, qui est précédé par des changements de métabolisme. Etant dépendant de la synthèse des osmolytes, elle varie considérablement en fonction des facteurs intra ou extracellulaires et donc est très dynamique dans le temps (Beauzamy et al., 2014 ; Ikeda *et al.*, 2019).

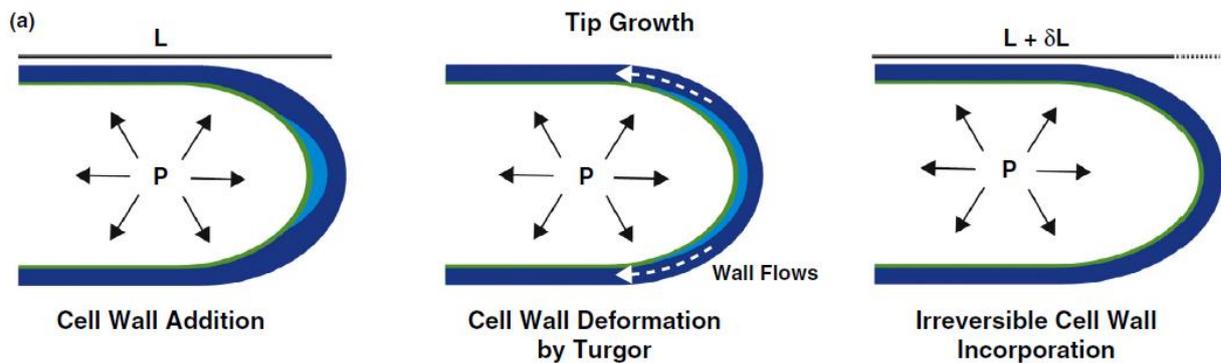


Figure 1.9 Influence de la pression de turgescence sur la croissance des levures à fission

Pendant la croissance, le nouveau matériel est ajouté à l'extrémité de la cellule. Pour maintenir l'épaisseur de la paroi cellulaire constante il faut que le matériel de la paroi cellulaire s'écoule de l'apex vers les côtés de la cellule. (Davi et Minc, 2015)

L'élongation de la cellule est provoquée par la déformation irréversible de la paroi cellulaire, elle-même étirée par la pression de turgescence (Lockhart, 1965 ; Minc et al., 2009 ; Davi et Minc, 2015). Au niveau cellulaire, la pression de turgescence pousse la membrane plasmique contre la paroi cellulaire et provoque une tension mécanique dans le plan à l'intérieur de la paroi cellulaire. La paroi cellulaire rigide, se développe avec l'approvisionnement du nouveau matériel et l'écoulement de ce dernier de l'apex vers les côtés de la cellule, jusqu'à l'équilibre. Puis les osmolytes sont reproduits par le métabolisme, la pression interne ré-augmente et ainsi de suite. Par conséquent, la pression de turgescence est l'un des facteurs déterminants pour la croissance (Figure 1.9).

Beauzamy et al., suggèrent (Beauzamy et al., 2014) que les cellules de plantes mesurent leur pression intracellulaire par osmosensibilité, ce qui pourrait être généralisé pour toutes les cellules à paroi. Les cellules peuvent également suivre la déformation de la membrane plasmique grâce aux protéines mécanosensibles de la membrane plasmique. Ce qui peut induire des réponses (métaboliques ou de la réorganisation de la paroi) lors d'un changement de la turgescence. La turgescence n'est pas seulement la réponse aux facteurs intra et extracellulaire, mais c'est aussi une voie de signalisation (Beauzamy et al., 2014). La seule composante cellulaire qui peut appliquer une force physique dans la direction normale à la surface du site de croissance est la turgescence. Elle génère une force qui permet aux hyphes de pénétrer des substrats (Bastmeyer et al., 2002 ; Gow et al., 2018). La question qui reste à étudier est de savoir si les champignons pathogènes utilisent seulement la force ou une combinaison de force et de dissolution enzymatique du tissu hôte pour une croissance invasive.

Mesures de la pression de turgescence

La science s'intéresse à la pression de turgescence au sein des organes, des tissus et des cellules depuis quelques décennies. De nombreuses méthodes de mesure ont été développées, certaines permettent de faire des mesures directes, d'autres indirectes. Dans cette partie les différentes méthodes de mesure de la pression turgescence d'une cellule à paroi seront présentées.

Techniques de mesure indirecte de la pression de turgescence

Mesure de la pression de turgescence par plasmolyse. (Figure 1.10G) La valeur de la pression osmotique interne (pression de turgescence) d'une cellule est déterminée en l'équilibrant avec la pression osmotique du milieu environnant. Si le milieu extracellulaire d'une cellule fongique est très concentré en osmolytes, la cellule perd de l'eau à travers la membrane plasmique. La plasmolyse est l'état cellulaire résultant, qui se manifeste par la perte de la turgescence provoquant différents changements morphologiques, comme la séparation de la membrane plasmique de la paroi cellulaire. Pour utiliser cette méthode, la variation de volume cellulaire, entre l'état turgescence et le début de la plasmolyse, est négligée, ce qui est justifié par la rigidité de la paroi cellulaire. Pour déduire leur pression de turgescence, les cellules sont mises dans des bains d'osmolarité, quand la concentration des osmolytes du bain est égal à la concentration intracellulaire, la plasmolyse commence, ainsi la pression de turgescence est déduite :

$$P_{cellule} = P_{bain} = M_{bain}iRT \quad (1.1)$$

Où M_{bain} est la molarité de la solution contenue dans un litre compartiment, i le facteur de Van't Hoff qui représente le nombre de particules distinctes produites lorsque la substance est dissoute (par exemple $i=2$ pour KCl), R la constante des gaz ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) et T la température en Kelvin. (Money, 1990 ; Bastmeyer et al., 2002) Cette technique est facile à mettre en œuvre car la mesure du volume n'est pas requise, mais les hypothèses que la paroi cellulaire est infiniment rigide et qu'aucune osmorégulation ne se produit, conduisent à une surestimation de la turgescence. (Howard et Valent, 1996). (Bastmeyer et al., 2002).

Mesure de la pression de turgescence par osmomètre du point de fusion. (Figure 1.10G) Le point de fusion des cristaux du milieu intracellulaire est indicatif de la concentration d'osmolyte cellulaire. Cette méthode, implique une étape froide, pour mesurer points de fusion il faut que le cytoplasme de la cellule soit congelé. Le point de fusion est en corrélation avec concentration de soluté intracellulaire ; à titre exemplaire l'eau distillée se solidifie à 0°C , et une solution de KCl avec une osmolalité de 1000 mmol/kg se solidifie à une température de $-1,86^\circ\text{C}$ (Geitmann, 2006).

Les deux méthodes de mesures indirectes de la pression de turgescence sont intrusives et impliquent la mort cellulaire, ne permettent donc pas suivre les modifications de turgescence au cours de la croissance.

Techniques de mesure directe de la pression de turgescence

Mesure de la pression de turgescence par une sonde de pression. (Figure 1.10H) La sonde de pression était la première méthode permettant une mesure directe de turgescence dans une cellule spécifique. Dans la première version (Green, 1968), un petit capillaire rempli d'eau et contenant une bulle d'air est insérée dans une cellule (Geitmann, 2006). La pression de turgescence est déduite à partir des variations du volume de la bulle. La méthode a ensuite été améliorée en remplissant le capillaire d'huile relié à un capteur de pression (Hüsken et al., 1978 ; Beauzamy et al., 2014). Lorsque la pointe d'une micropipette remplie d'huile est insérée dans le cytoplasme fongique, la pression de turgescence entraîne une partie du milieu intracellulaire dans la pipette et fait remonter l'huile. La pression de turgescence de la cellule peut être mesurée, en appliquant et mesurant la pression nécessaire pour repousser l'huile à la hauteur initiale, avant l'insertion dans la cellule. Comme le diamètre de la micropipette ne peut être inférieur à quelques microns seules des cellules ou hyphes relativement grandes peuvent être percés, ce qui limite l'utilisation de cette technique pour des espèces présentant des cellules plus petites que le diamètre de la pipette (Bastmeyer et al., 2002).

Mesure de la pression de turgescence par tonomètre à bille. (Figure 1.10I) Cette méthode non invasive d'évaluation de la turgescence pour une seule cellule a été développée par Lintilhac et Wei (Lintilhac et al., 2000). Une bille de verre attachée à un cantilever applique une charge sur la cellule. En divisant la force mesurée par la surface de contact entre la bille et la cellule, mesurée optiquement, la pression interne est quantifiée, à condition que la force de réaction de la paroi cellulaire soit négligeable. (Geitmann, 2006 ; Beauzamy et al., 2015).

Mesure de la pression de turgescence par micromanipulation. (Figure 1.10J) Une seule cellule est comprimée entre une sonde cylindrique à extrémité plate et une surface plane, donnant une valeur de 0,3 MPa dans les cellules individuelles de tomate. Ces approches sont efficaces mais l'interprétation des résultats sous-estime la contribution de la paroi cellulaire à la rigidité cellulaire (Geitmann, 2006).

Mesure de la pression de turgescence par microscope à force atomique. (Figure 1.10C) L'utilisation d'instruments plus raffinés comme un microscope à force atomique (AFM) permet de contrôler une très petite pointe et de cibler une cellule particulière. Cette méthode est non invasive, relativement rapide (5 ~ 20 min), et les cellules n'ont pas besoin de traitement pour être étudiées. Plus la profondeur d'indentation augmente, plus la force augmente, à partir de la courbe force-indentation il est possible de déterminer les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire avec des modèles mécaniques et en déduire la pression de turgescence (Beauzamy et al., 2014). Mais cette déduction est encore une question ouverte et discutée au sein de la communauté scientifique.

Ces méthodes s'appliquent à des tissus ou des cellules relativement grosses (dizaines de micron). Pour étudier le cas de cellules plus petites, il est important développer de nouvelles approches qui ne sont pas destructrices et qui leur sont applicables.

Dans le cadre de ma thèse, un des objectifs est d'estimer la pression de turgescence de *Candida albicans* pendant une croissance invasive. Pour ce cas de figure, aucune des techniques listées ci-dessus ne nous permettront de mesurer la pression, mais depuis

quelques années une nouvelle méthode est de plus en plus utilisée. Cette méthode permet également d'étudier la croissance des levures sous contraintes, lorsqu'une force s'y oppose.

Mesure de la pression de turgescence par puits microfabriqués. (Figure 1.11) « Cette méthode consiste à utiliser des puits microfabriqués en élastomères à propriétés élastiques contrôlées comme capteurs de force à cellule unique » (Minc et al., 2009). L'hyphe lors de sa croissance dans le puit, le déforme considérablement. En mesurant cette déformation du puit, dont on connaît les propriétés élastiques, il est possible de déduire la force qui lui a été appliquée par la cellule. Ce qui permet avec un modèle de croissance adapté d'estimer la valeur de la pression de turgescence. (Minc et al., 2009). Le modèle de croissance sera présenté en détail dans la partie 1.2.3. Tayagui et al. (Tayagui et al. 2017) ont également utilisé une méthode mettant en jeu la déformation d'un élastomère, mais en géométrie piliers dans des canaux et non puits. Le dispositif développé dans cet article peut être utilisé pour de nombreuses cellules et organismes qui présentent une croissance filamenteuse. Cette méthode permet de faire la part des mécanismes moléculaires et biomécaniques (Tayagui and al., 2017).

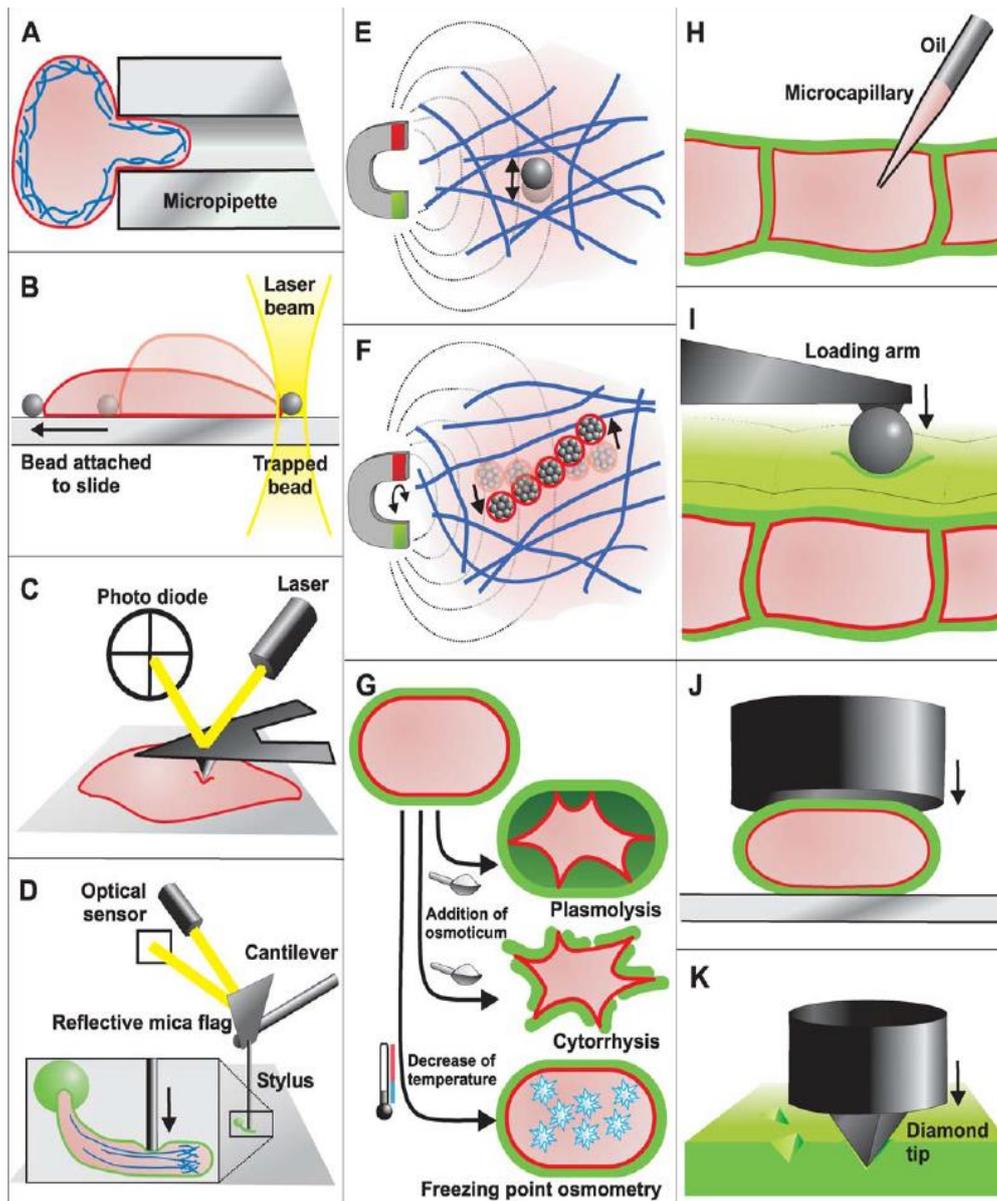


Figure 1.10 Schématiques simplifiés des approches cytomécaniques

Les dessins ne sont pas à l'échelle. La membrane plasmique est représentée en rouge, les éléments cytosquelettiques en bleu et les parois cellulaires en vert. (A) Aspiration par micropipette (B) Déformation cellulaire globale avec des pinces optiques (C) Microscopie à force atomique (D) Micro-indentation (E) Rhéométrie à billes magnétiques (F) Microrhéologie rotationnelle magnétique (G) Méthodes indirectes pour mesurer la pression de turgescence. : plasmolyse, cytorrhysie et osmométrie au point de congélation. (H) Sonde de pression (I) Tonomètre à billes (J) Compression de cellules individuelles (K) Nano-indentation. (Geitmann, 2006)

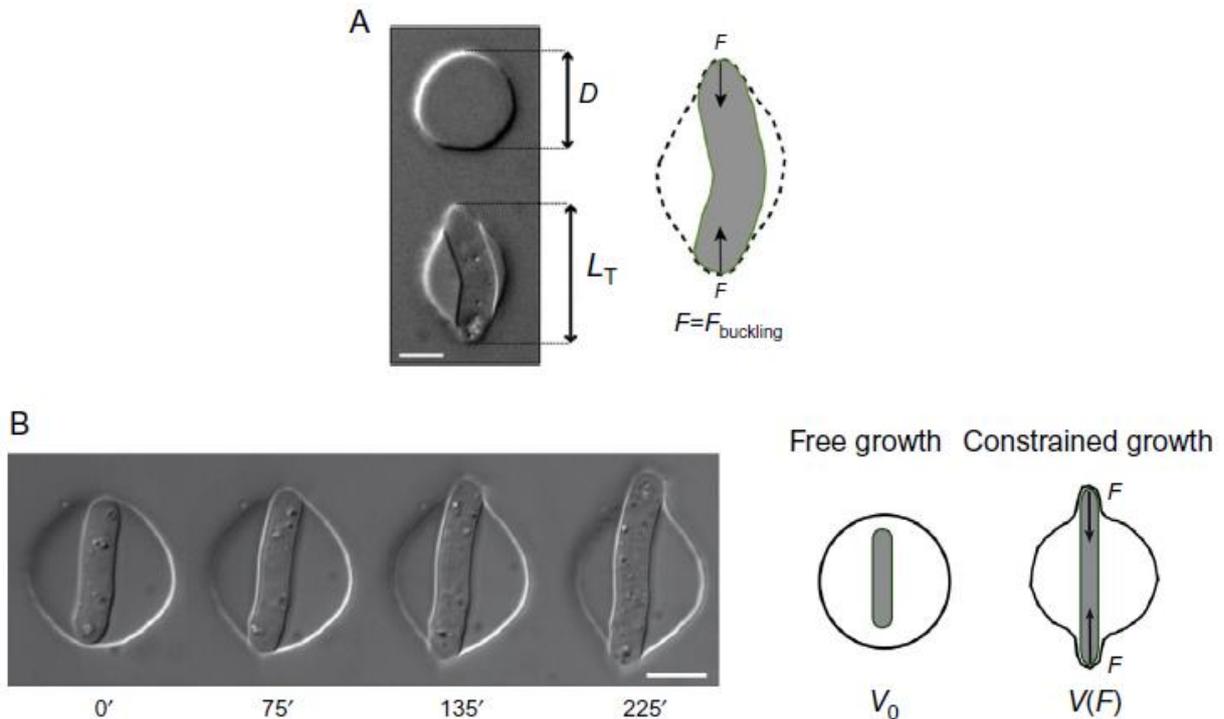


Figure 1.11 Mesure de la loi force – vitesse, et de la turgescence de cellules de levure dans des puits microfabriqués

(A) Image d'une cellule de *Schizosaccharomyces pombe* dans un puit déformable. La force de flambage de la cellule équilibre la force de déformation de la chambre. (B) La croissance des cellules et la déformation d'un micropuit, plus la déformation est grande plus la force augmente. (Minc, 2009)

1.2.2. Propriétés mécaniques de la paroi cellulaire

Les cellules peuvent être considérées comme des structures mécaniques complexes. D'un côté elles sont capables de résister aux forces physiques externes et de l'autre elles exercent elles-mêmes des forces, induite par la pression de turgescence. Pour comprendre l'aspect mécanique de l'architecture cellulaire et comprendre comment les cellules sont capables de percevoir et de réagir aux forces mécaniques, il faut étudier et quantifier leurs propriétés physiques (Geitmann, 2006).

Dans la partie *C. albicans*, Paroi cellulaire (1.1.2), la composition de la paroi a été discutée, sa propriété élastique a également été évoqué ainsi que son importance dans les processus biochimiques. Dans cette partie on va parler de la paroi cellulaire en tant qu'un matériau physique, nous parlerons de ses propriétés mécaniques et de la corrélation de l'élasticité aux autres paramètres et son rôle dans la biomécanique. Les différentes méthodes de quantification des paramètres mécanique tels que l'élasticité, l'épaisseur et les forces exercées par la cellule seront présentés.

La paroi cellulaire permet à la cellule à la fois de maintenir une structure rigide et de s'allonger grâce à son extensibilité. Les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire sont régulées par sa composition et sa structure, et ces derniers dépendent de facteurs intra et extra cellulaires (Figure 1.12). En revanche la corrélation entre la composition, la structure de la paroi et la morphogénèse est encore une question ouverte pour la communauté scientifique. En 2015 Davi et Minc, ont adressé cette question et ont observé que les défauts de la composition ou de l'épaisseur de la paroi cellulaire, ont des conséquences sur la forme des cellules et la morphogénèse. Ce qui prouve l'importance des propriétés (mécaniques et biologiques) de la paroi cellulaire, pour la morphogénèse (Davi et Minc, 2015). De ce fait il est crucial d'établir ces liens chez *C. albicans* également.

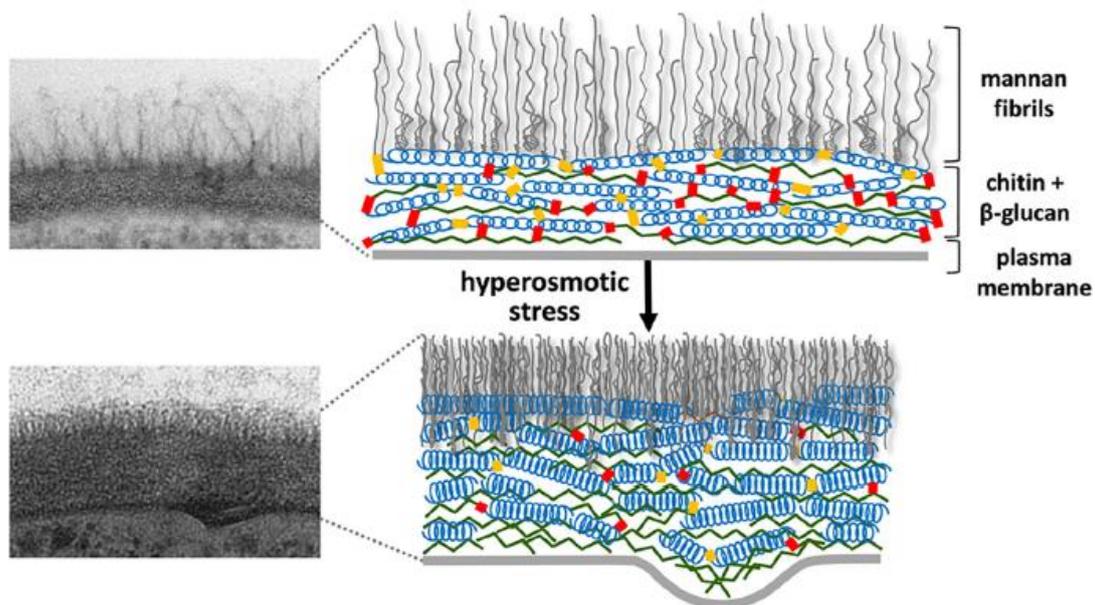


Figure 1.12 Modèle de plasticité de la paroi cellulaire et des changements architecturaux survenant dans des conditions de stress hyperosmotique

A gauche, images par microscopie électronique à transmission des parois cellulaires de cellule dans un milieu isotonique (en haut) et de cellule immédiatement après un choc hyperosmotique (en bas). A droite les schémas illustrent les changements structurels possibles : membrane plasmique - ligne grise épaisse horizontale ; chaînes de chitine - lignes vertes ; β -glucane - bleues ; fibrilles de mannane - lignes grises verticales ; liaisons croisées entre β -glucane et chitine - rouge ; liaisons croisées entre β -glucanes - jaune. L'augmentation rapide de l'épaisseur de la paroi cellulaire qui suit le choc hyperosmotique implique la compression des β -glucane et le glissement des polymères de chitine et β -glucane l'un sur l'autre. (Ene et al., 2015)

Définition

Extensibilité. L'extensibilité est une mesure de combien la paroi cellulaire se dilate en termes de surface lorsque la pression à l'intérieur de la cellule est augmentée. Bien que la pression soit la force motrice de la croissance, le taux de croissance à l'apex dépend de l'extensibilité de la paroi et de l'apport de nouveau matériaux constitutifs de la paroi. L'expansion de la paroi se produit à l'apex et elle peut être élastique et réversible ou bien

plastique et irréversible. Pendant la croissance cellulaire, la paroi cellulaire est tendue irréversiblement, c'est donc une déformation plastique, qui est obtenue par l'incorporation de nouveaux matériaux de paroi et de membrane à l'apex. La relation classique proposée par Lockhart est que le taux de croissance dépend de l'extensibilité, pour une pression supérieure à un seuil critique (Lockhart, 1965) :

$$\frac{1}{l} \frac{dl}{dt} = \beta(\Delta\Pi - P_E) \quad (1.2)$$

Avec l la longueur du filament, β une constante dépendant du rayon de filament, de l'épaisseur et de l'extensibilité de la paroi cellulaire et de la perméabilité de l'eau, $\Delta\Pi$ est la différence entre la concentration de solutés osmotiquement actifs dans la cellule et la pression osmotique de la solution dans laquelle une cellule est immergée et P_E est la contrainte critique.

Elle a été vérifiée pour plusieurs espèces. Autrement dit, la déformation plastique de la paroi cellulaire nécessite une turgescence minimale, en dessous de laquelle l'expansion ne se produira pas. (Lew, 2011).

Pour caractériser un matériau élastique, on parle souvent du module d'élasticité, ou module d'Young (Y), cette grandeur donne l'idée de l'ampleur de la déformation du matériau quand celui-ci subit une contrainte. Elle a la dimension d'une pression (Pa) plus elle est grande plus le matériau est rigide. Etant donné que l'extensibilité de la paroi cellulaire dépend de sa composition et de sa structure, son module de l'élasticité peut être vu comme une mesure physique de la composition et de la structure. Les mesures du module d'élasticité effectuées par Davi sur *Saccharomyces pombe* ont montré que la paroi cellulaire est plus élastique aux sites de croissance et donc relativement plus rigide sur les côtés. (Davi et Minc, 2015).

Épaisseur. Dans la partie précédente de ce chapitre on a déjà vu que la paroi cellulaire est une organelle dynamique qui modifie sa composition et sa structure au cours de la morphogénèse et par conséquent son épaisseur est aussi dynamique. Historiquement la paroi cellulaire n'était étudiée que par microscopie électronique, ce qui a biaisé la compréhension de cette organelle, qui a longtemps été pensée statique (Miller et al., 1974 ; Walker et al., 2018). L'épaisseur est l'un des paramètres clés des propriétés mécaniques de la paroi et influence la croissance cellulaire. Il a été observé par Davi et al., sur la levure *Schizosaccharomyces pombe*, modèle commun pour la croissance hyphale, que la paroi cellulaire était systématiquement plus mince à l'apex que sur les côtés de l'hyphé, et que l'épaisseur à ce niveau ne varie pas dans le temps (Davi et al., 2018). Sans turgescence, le dépôt de nouveaux matériaux devrait donner une paroi cellulaire plus épaisse sans croissance, et la turgescence seule ne résulterait qu'en un amincissement de la paroi jusqu'à la lyse (Lew, 2011). Les résultats de Davi et Minc (Davi et Minc, 2015) montrent que la réalité est entre les deux cas. L'apport de nouveaux matériaux épaissit la paroi cellulaire et l'allongement cellulaire l'amincit, à partir de ce postulat la conservation de masse peut être écrite, qui se traduit en une évolution dynamique de l'épaisseur (Davi et al., 2018) :

$$\frac{dh_{pex}}{dt} = S - \gamma h_{apex} \quad (1.3)$$

Où S est un taux de synthèse de paroi par unité de surface et γ est le taux de la déformation. (Figure 1.13) Le taux d'élongation des cellules, G_r , est prédit (Davi et al., 2018) comme un multiple du taux de déformation γ et du rayon de courbure à l'apex R_c :

$$G_r = dL/dt = qR_c\gamma \quad (1.4)$$

Avec L la longueur de la cellule et q un facteur numérique. Davi et al. (Davi et al., 2018) ont également confirmé, que l'épaisseur est régulée en amincissant ou épaississant la paroi de tel sorte que les variations ne dépassent pas 30% d'épaisseur (Davi et al., 2018).

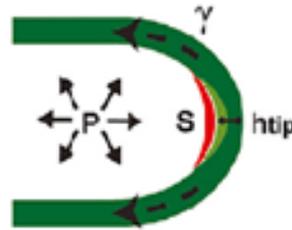


Figure 1.13 Croissance de la paroi cellulaire (Davi et al., 2018)

Selon Davi et Minc le module de surface, $\sigma = hY$, qui est le produit du module de l'élasticité et de l'épaisseur de paroi, serait le paramètre le plus pertinent pour comprendre la contribution de la mécanique des parois à la morphogenèse (Davi et Minc, 2015). Les valeurs des modules élastiques de la paroi cellulaire Y sont plus faibles aux sites de croissance que sur les côtés. Ensemble, ces résultats suggèrent que la polarité interne, qui dirige la croissance et la synthèse de la parois cellulaire, amincit et rend moins rigide les sites de croissance polaire.

Rôle des propriétés mécaniques de la paroi cellulaire

Influence de l'épaisseur sur les taux de déformation et de croissance. Davi et al., ont posé que la vitesse de déformation pourrait s'écrire :

$$\gamma = r \frac{PR_c}{Yh_{apex}} \quad (1.5)$$

Avec r un taux de remodelage de paroi, Y le module élastique de la paroi, et P la pression de turgescence. En prenant en considération l'équation $G_r = dL/dt = qR_c\gamma$ (1.4), le taux d'allongement est proportionnel à :

$$G_r \approx R_c^2/h_{apex} \quad (1.6)$$

La validité de cette hypothèse a été vérifiée numériquement et expérimentalement par Davi et al., ce qui suggère que à partir de l'épaisseur de la paroi cellulaire il est possible de déterminer le taux d'élongation. Etant donné que les variations de l'épaisseur sont contrôlées, par conséquent les valeurs de taux de croissance sont également maintenues autour d'une plage définie (Davi et al., 2018). Pour adapter la rigidité, la variation de l'épaisseur de la paroi est la stratégie suivie par les différents espèces Schizosaccharomyces (Davi et al., 2018).

Influence du module de surface et du module d'Young sur le diamètre hyphal. Dans l'étude de Davi et al., 2019 le module de surface ($\sigma = hY$) de la paroi cellulaire est corrélé avec le diamètre de la cellule. Les variations de la rigidité de paroi parmi les cellules, résultent en des variations de diamètre hyphale, ainsi ce dernier peut être prédit à partir de module de surface, de ce fait le module de surface peut être considéré comme un facteur de régulation du diamètre. Le module élastique Y augmente avec le diamètre des cellules, Davi en déduit que ces changements dans la mécanique de la paroi cellulaire résultent dans des variations de diamètre.

Toujours dans cette étude de Davi et al., 2019, il a été observé que les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire sur les côtés sont plus fortement corrélées au diamètre que celles de l'apex. Sachant que la paroi latérale est plus rigide que celle à l'apex, et que le diamètre en dépend, il est judicieux de penser que la paroi en expansion se rigidifie pour limiter davantage l'expansion. Cette rigidification est probablement due à la réorganisation des polymères de la paroi.

Les cellules sont capables de suivre localement et globalement grâce aux systèmes internes (les voies de signalisations) les caractéristiques géométriques dynamiques (épaisseur, diamètre, l'élasticité et la rigidité). Haupt et Minc suggèrent que surveiller et réguler ces caractéristiques : épaisseur, diamètre, l'élasticité et la rigidité, ainsi que la courbure permet à la cellule d'assurer une polarisation, une signalisation, et donc de contrôler sa morphogenèse et son comportement (Haupt et Minc, 2018).

Mesures de l'élasticité, de l'épaisseur et de la force

Pour une étude quantitative de la mécanique il faut appliquer des contraintes calibrées sur le matériau auquel on s'intéresse, et il faut mesurer sa réponse. Le changement de longueur résultant de l'application d'une contrainte de traction montre l'élasticité de l'objet d'étude. L'étude biomécanique des propriétés physiques d'une cellule utilise les mêmes principes mécaniques, ce qui présente un défi technique car des dispositifs expérimentaux qui permettent de faire de mesures à l'échelle cellulaire doivent être développés.

Mesure de l'élasticité de la paroi cellulaire par indentation. (Figure 1.10 C et K) Les techniques les plus répandues pour mesurer l'élasticité de la paroi cellulaire sont basées sur des expériences d'indentation, comme la microscopie à force atomique, la micro- et nano-indentations. Le principe est le même dans les trois cas, une sonde appuie sur un échantillon tandis que les forces résultantes et les profondeurs d'indentation sont mesurées. Dans la microscopie à force atomique c'est une pointe microscopique fixée à un cantilever flexible qui déforme localement la surface de la cellule. La flexion du cantilever, contrôlée par la réflexion d'un faisceau laser, fournit des informations sur la force appliquée. Le rapport entre la force mesurée et la profondeur d'indentation donne la raideur apparente de la cellule. La rigidité mesurée avec cette méthode est influencée par divers facteurs, tels que la géométrie de la sonde, l'épaisseur de la paroi cellulaire et la pression de turgescence. Etant donné que c'est l'élasticité dans le plan orthogonal de la contrainte qui détermine la capacité de la paroi cellulaire à résister à la pression de turgescence, il faut que la profondeur de l'indentation soit

supérieure à l'épaisseur de la paroi cellulaire pour qu'elle soit étirée latéralement. (Willemssen et al., 2000 ; Geitmann, 2006 ; Burri et al., 2018)

Mesure de l'élasticité de la paroi cellulaire par micromanipulation. (Figure 1.10 A, B et J) Aspiration par micropipette : Un microcapillaire est placé à la surface de la cellule, et la cellule est aspirée dans l'ouverture (Hochmuth, 2000). Déformation cellulaire avec des pinces optiques : La cellule est étirée en éloignant l'une l'autre deux sphères attachées aux extrémités opposées de la cellule et piégées dans un faisceau laser, qui permet leur déplacement (Hénon et al., 1999). Compression de cellules uniques : Une cellule est comprimée entre deux plaques (Wang et al., 2004 ; Geitmann, 2006). Les propriétés physiques de la paroi cellulaire sont calculées à partir des déformations des cellules en appliquant des modèles théoriques.

Mesure de l'élasticité par ablation par laser. On utilise ici la destruction par un faisceau laser. On mesure la variation du rayon hyphal avant et après ablation par le laser et on suppose que le matériau de la paroi cellulaire est homogène et isotrope, et son coefficient de Poisson est 0 (Atilgan et al., 2015 ; Davi et al., 2019). A partir de l'équilibre entre les forces de tension et de pression, les rapports de module d'Young sur la pression de turgescence pour la paroi latérale peut être établi :

$$\frac{Y_{lateral}}{\Delta P} = \frac{R_1}{h_{lateral} R_1^*} \quad (1.7)$$

Où $R_1^* = \frac{R_1 - R_0}{R_0}$, R_0 étant le rayon de la cellule dégonflée et R_1 le rayon de la cellule avant l'ablation. Et pour l'apex :

$$\frac{Y_{apex}}{\Delta P} = \frac{R_c}{2h_{apex} R_c^*} \quad (1.8)$$

Où $R_c^* = \frac{R_c - R_{c0}}{R_{c0}}$, R_{c0} étant le rayon de courbure à l'apex de la cellule dégonflée et R_1 le rayon de courbure à l'apex de la cellule avant l'ablation.

Mesure de l'élasticité par des chambres microfabriquées. (Figure 1.11) La déformation du puit microfabriqué induites par la croissance des cellules permet également de mesurer l'élasticité de la paroi en outre de la pression de turgescence. Minc et al., ont considéré la cellule comme une tige élastique, qui flambe, c'est-à-dire passe d'une forme droite à une forme courbée. Cette transition est induite par la force longitudinale exercée par le puit sur la cellule. La turgescence est compensée par la tension dans la paroi cellulaire, la force critique de flambement est donc indépendante de la turgescence et s'écrit (d'après Minc et al., 2009) :

$$F_B = \frac{\pi^2 I Y}{L_T^2} \quad (1.9)$$

Avec $I = \pi h R^3$, le moment quadratique de la couche de paroi cellulaire, L_T la longueur de la cellule (du cylindre considéré) et Y le module élastique de la paroi cellulaire. Remplaçant par I et simplifiant, (1.10) mène à :

$$F_B = \frac{\pi^3 R^3 h Y}{L_T^2} \quad (1.10)$$

L_T la longueur de la cellule (du cylindre considéré), R le rayon de la cellule et h l'épaisseur de la paroi cellulaire. La déformation de la chambre $d = L_T - D$, avec D diamètre de la chambre au repos, E_{ch} le module de la chambre, fournit simultanément une mesure de la force, F , exercée par la cellule sur la chambre :

$$F = \frac{8}{3} E_{ch} R d \quad (1.11)$$

L'équilibre des forces, $F_B = F$, conduit à

$$d = \left(\frac{3\pi^2}{8} \frac{R^2}{(D+d)^2 E_{ch}} \right) Y h \quad (1.12)$$

Dans laquelle le module d'élasticité effectif pour la chambre est introduit :

$$E^* = \frac{8(D+d)^2}{3\pi^2 R^2} E_{ch} \quad (1.13)$$

Ainsi la relation entre la déformation de la chambre et le module de surface de la paroi est obtenu :

$$d = \frac{Y h}{E^*} \quad (1.14)$$

Cette relation permet de calculer le module de surface de la paroi cellulaire, $\sigma_p = Y h$. Les auteurs (Minc et al., 2009) ont mesuré le comportement de cellules de longueur variable dans des chambres de différents diamètres et élasticités, ce qui leur a permis de faire varier d et E^* et en déduire le module d'élasticité (Minc et al., 2009).

Mesure de l'épaisseur de la paroi par microscopie. Une approche récente établie par Davi (Davi et al., 2018) utilisant la microscopie permet de quantifier l'évolution dynamique de l'épaisseur de la paroi cellulaire. En marquant les faces interne et externe de la paroi cellulaire par des molécules fluorescentes, la distance entre les centres des deux signaux fluorescents peut être mesurée sur l'image prise par un microscope. Cette distance est l'épaisseur de la paroi cellulaire (Figure 1.14). (Davi et al., 2018).

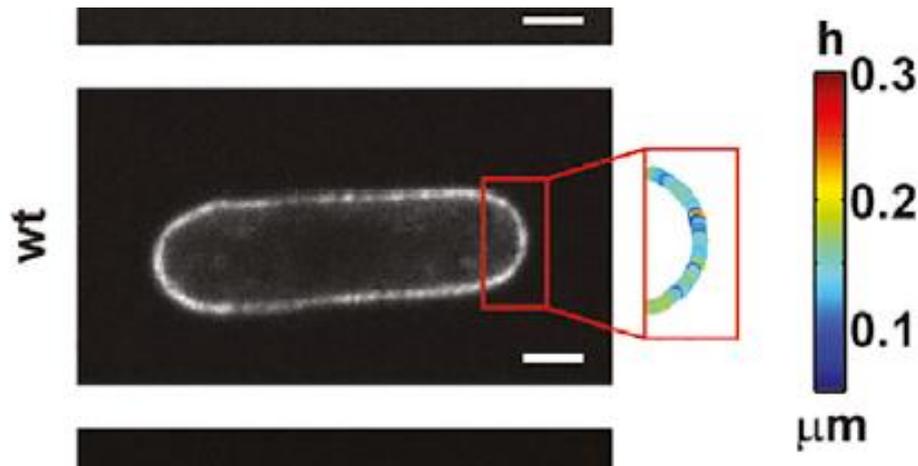


Figure 1.14 Dynamique de l'assemblage de la paroi cellulaire sur les sites de croissance polaires

Images confocales de cellules de souche sauvage de *S. pombe* exprimant le marqueur membranaire GFP et des cartes de couleurs h locales. (Davi et al., 2018)

Techniques de mesure indirecte de la force

Bien que la force invasive dérive de la turgescence, la force réelle dépend de l'interaction de pression de turgescence et caractéristiques de la paroi cellulaire. Les méthodes de mesure de la force indirecte utilisent la capacité de croissance des hyphes en substrats de rigidité connue.

Expérience de pénétration d'agar. (Figure 1.15 a) Les tests de pénétration sur gel d'agar permettent d'estimer la rigidité de la paroi cellulaire et la turgescence. Comme la force résistive des gels d'agar peut être mesurée, la pression et la force exercées par des hyphes peuvent donc être estimés (Bastmeyer et al., 2002).

Expérience de pénétration avec membranes. (Figure 1.15 b) En 1895, la perforation d'une aiguille cylindrique en verre de forme hyphale a été utilisée pour déterminer la contrainte nécessaire pour la pénétration de membranes d'or, cette valeur a ensuite été mis à l'échelle de diamètre hyphale. (Miyoshi, 1895 ; Bastmeyer et al., 2002).

Techniques de mesure directe de la force

Mesure de la force par jauge de contrainte. (Figure 1.15 c) Les forces générées par des hyphes peut être directement mesuré avec une jauge de contrainte ultra-sensible composée d'une poutre de silicium avec un élément résistif électrique. Lorsque la jauge de contrainte miniaturisée est positionnée dans le milieu de culture de sorte que les hyphes en croissance poussent la poutre de silicium, celle-ci est déformée, et la résistance électrique de l'appareil change proportionnellement à la force appliquée (Bastmeyer et al., 2002).

Microscopie de guides d'ondes. (Figure 1.15 d) Bechinger et al. ont utilisé une méthode optique basée sur la microscopie de guide d'ondes pour mesurer les forces exercées par un champignon phytopathogène. L'idée de base de la technique repose sur la réflexion interne totale. Le substrat en PDMS déformable est utilisé comme guide d'onde. Connaissant son

épaisseur, son module d'élasticité et sa topographie, en faisant pousser une hyphe à sa surface, à partir de la déformation induite par la croissance une image de l'indentation correspondante est obtenue et la force induisant la déformation peut être déduite (Bechinger et al. 1999 ; Bastmeyer et al., 2002).

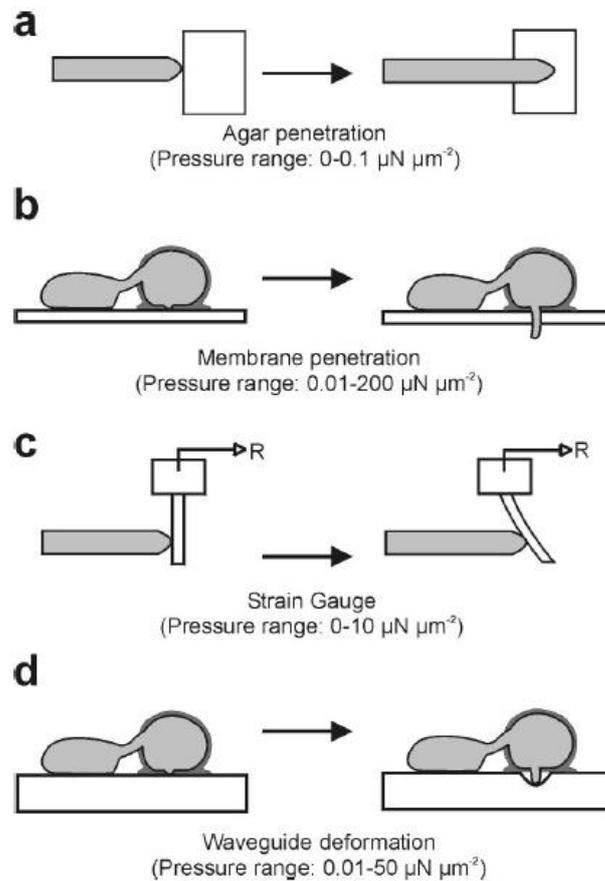


Figure 1.15 Techniques de mesures de force

(a) Pénétration de l'agar (b) Pénétration membranaire (c) Jauge de contrainte (d) Microscopie à guide d'ondes. (Bastmeyer et al., 2002)

Mesure de la force par les chambres microfabriquées. De la même manière que pour la mesure de la pression interne et l'élasticité de la paroi, des cellules poussant dans des puits sont considérées comme des cylindres, la force élastique due à la déformation s'exprime par (Minc et al., 2009) :

$$F = \frac{8}{3} E_{ch} R d \quad (1.15)$$

Où E_{ch} est le module d'Young du substrat, R est le rayon de l'hyphes, d est la déformation induite par la cellule, le constant $8/3$ prend en compte de la géométrie de la pointe hyphale en contact avec un solide élastique.

Il faut noter que cette méthode permet de mesurer plusieurs propriétés mécaniques de la paroi cellulaire, la pression de turgescence, le module d'élasticité de la paroi cellulaire et la force appliquée par l'hyphes sur un substrat élastique.

1.2.3. Modèle de la croissance hyphale

Le premier modèle de croissance de cellule à parois (végétales) fut établi par Lockhart dans les années 60 (Lockhart, 1965). Son modèle suppose la paroi cellulaire comme un matériau viscoplastique linéaire, il prend en compte son extensibilité, sa perméabilité à l'eau et de la taille des cellules et permet de calculer l'élongation cellulaire en fonction de la pression osmotique. Etant donnée que la croissance fongique ne nécessite pas de flux d'eau, le modèle de Lockhart a été récemment repris et adapté à la croissance fongique (Bovio et al., 2019 ; Jong et al., 2020). On sait que l'expansion cellulaire est contrôlée par l'équilibre entre la pression de turgescence tirant sur la paroi cellulaire et la rigidité de la paroi cellulaire résistant à cette pression. Il est important de modéliser la croissance pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au développement.

Dans cette partie les différents modèles de croissance fongique sont présentés brièvement, et le modèle viscoplastique, sur lequel ce base le projet de ma thèse sera discuté en détail.

Modèle ne prenant pas en compte les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire.

La modélisation de la croissance de la pointe fongique se compose de deux parties : le transport des polysaccharides composants de la paroi cellulaire vers la paroi cellulaire et la croissance de la paroi cellulaire. En supposant que la croissance est orthogonale à la surface du site de croissance et que le matériau est transporté en ligne droite vers l'apex de la paroi cellulaire, Bartnicki-Garcia et Gierz sont arrivés à un modèle qui présente les caractéristiques de la croissance apicale (Bartnicki-Garcia et al., 1995 ; Jong et al., 2020).

Modèle supposant que la paroi cellulaire est une mince feuille visqueuse. Le modèle établi par Campàs et Mahadevan prend en compte le fait que l'apex se déforme plus facilement que la paroi latérale, en supposant que la paroi cellulaire est une mince feuille visqueuse (Campàs et Mahadevan, 2009). Goriely et al. ont inclus dans leur modèle une réponse élastique de la paroi cellulaire (Goriely et Tabor, 2003). Eggen et al. ont supposé que l'expansion de la paroi cellulaire dépend d'un processus de vieillissement (Eggen et al., 2011). Ces trois modèles présentent les caractéristiques de la croissance à l'apex (Jong et al., 2020).

Modèle combiné. Jong, Hulshof et Prokert ont combiné et le travail de Bartnicki-Garcia et Gierz (2001) et le travail de Campàs et Mahadevan (2009). Ils ont construit leur modèle sur deux suppositions : que le matériau de construction de la paroi cellulaire est transporté en ligne droite à partir d'une source ponctuelle isotrope, et que la paroi cellulaire est une mince feuille visqueuse. L'épaisseur de la paroi cellulaire étant considéré constant sur toute l'hyphale, la paroi cellulaire doit s'étirer, sinon la paroi cellulaire s'épaissirait à l'apex. De plus, ils ont inclus une nouvelle équation qui modélise la rigidification de la paroi cellulaire avec le temps. Ce modèle est appelé BATS (Ballistic Ageing Thin viscous Sheet Model) (Jong et al., 2020).

Modèle viscoplastique

Dans ce modèle, une pression de turgescence élevée produit le travail nécessaire pour la déformation de la nouvelle paroi cellulaire déposée à l'apex des cellules est induite par le travail de la pression de turgescence effectué. Cette déformation devient irréversible (plastique) passé un certain seuil de déformation associé à une valeur critique de la pression, P_c . De ce fait la croissance est considérée comme un processus viscoplastique (Minc et al., 2009 ; Davi et Minc, 2015).

Modèle viscoplastique pour la croissance cellulaire dans la levure de fission. Pour établir ce modèle Minc, Boudaoud et Chang ont considéré la levure filamenteuse comme un cylindre de rayon R , et de longueur L , avec une pression de turgescence P . Ils ont décrit la paroi cellulaire comme un matériau élastique avec un module de Young Y et une épaisseur h . Ce modèle considère que la croissance hyphale se produit sur un domaine de longueur R (rayon du cylindre) à l'apex. La tension longitudinale (le long de l'axe de la cellule) dans la paroi cellulaire induite par la pression de turgescence est :

$$T_p = \frac{PR}{2h} \quad (1.16)$$

Pour une croissance viscoplastique un seuil plastique e_p est défini, de telle sorte qu'au-delà de cette valeur l'élongation de l'hyphe soit irréversible. Ce qui se traduit en une croissance libre $v_0 = dL/dt$ proportionnelle à la déformation réduite, $\frac{T_p}{Y} - e_p$. Comme la croissance ne se produit que sur la longueur R , alors le taux de la croissance libre (ex. dans un milieu liquide) est :

$$v_0 = \frac{R}{\tau_V} \left(\frac{T_p}{Y} - e_p \right) \quad (1.17)$$

Où τ_V est un temps caractéristique viscoélastique qui prend en compte la géométrie de la pointe de la cellule, les variations du module d'Young de la paroi et d'autres processus biochimiques impliqués dans la polarisation.

La pression de turgescence totale, P , est la somme de deux composants, la première : la pression nécessaire pour atteindre la déformation plastique (e_p), P_c , et la deuxième : la pression de turgescence effective qui fixe le taux de croissance, ΔP . Ainsi on peut établir que $\Delta P = P - P_c$.

Autrement dit quand la pression totale (de turgescence) est égale à la pression critique, le taux de la croissance est nul. Ce qu'on peut formuler par $T_p / Y = e_p$. En remplaçant T_p dans l'équation 1.16 et en prenant $e_p = 1\%$, et les valeurs mesurées de σ_p dans une étude préalable (Boudaoud, 2003), les auteurs obtiennent :

$$P_c = \frac{\sigma_p e_p}{R} \sim 0.1 \text{ MPa} \quad (1.18)$$

Ainsi, en remplaçant dans 1.17, cela conduit à :

$$v_0 = \frac{R^2(P - P_c)}{\tau_V 2hY} \quad (1.19)$$

Croissance cellulaire sous contraintes. Comme on l'a vu dans la première partie de ce chapitre, les levures pathogènes croissent souvent sur les tissus cellulaires, les implants médicaux et arrivent même à pénétrer dans des matériaux et donc des tissus. Lorsqu'ils sont perforés, ces matériaux appliquent une force résistive sur les pathogènes. Pour modéliser ce cas de figure Minc, Boudaoud et Chang (Minc et al., 2009) ont repris leur modèle de la croissance libre et ont rajouté la force résistive, ce qui consistait à considérer que la tension dans la paroi est réduite de telle sorte que :

$$T = T_p - \frac{F}{2\pi R h} \quad (1.20)$$

Où F est la force s'opposant à la croissance. En supposant que τ_v est indépendant de la force externe, alors à partir de l'équation 1.19, pour le taux de croissance ils obtiennent :

$$v(F) = \frac{RT}{\tau_v Y} \quad (1.21)$$

qui, après simplifications donne :

$$v(F) = v_0 \left(1 - \frac{F}{\pi R^2 \Delta P} \right) \quad (1.22)$$

L'équation 1.22 décrit le changement de vitesse induit par la présence d'une force externe.

En faisant croître *Candida albicans* contre une force résistive on s'attend donc à une réduction du taux de croissance et en appliquant ce modèle on peut déterminer la pression de turgescence effective. La difficulté particulière de ma thèse était de faire croître *C. albicans* contre une force résistive, d'observer l'invasion dans l'élastomère, polydiméthylsiloxane, et d'estimer la force résistive ressentie par les hyphes de *C. albicans* pendant l'invasion.

1.3. Polydiméthylsiloxane (PDMS)

Le polydiméthylsiloxane est un polymère que l'on rencontre dans des applications différentes, il peut être utilisé (soit à l'état liquide, soit, réticulé, à l'état d'élastomère) comme des moules, joints, tensioactifs, hydrofuges, dispositifs biomédicaux, encapsulation diélectrique, agents lubrifiants etc. Il est de très grand intérêt à cause de ses propriétés comme sa stabilité thermique, résistance aux rayons UV, activité de surface, haute perméabilité aux gaz, hydrophobicité et non toxicité, inerte, faibles forces intermoléculaires et rigidité diélectrique, faible volatilité à haut poids moléculaire et haute volatilité à bas poids moléculaire, indice de réfraction optique proche celui du verre, cout faible (Kuo, 1999).

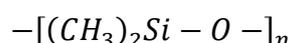
1.3.1 Polymère

Elastomère

« Un élastomère est un polymère présentant des propriétés élastiques, obtenues après réticulation. Il supporte de très grandes déformations avant rupture. » (Élastomère, 2019, Wikipédia, l'encyclopédie libre).

Polymère. La première fois le terme polymère a été utilisée en 1833 par J. Berzelius. Cependant, c'est dans les années 1930 que le concept de chaîne polymérique tel que nous l'entendons aujourd'hui a été établi par Hermann Staudinger, qui a obtenu le prix Nobel de chimie en 1953 (Mülhaupt, 2004 ; Ringsdorf 2004). Le polymère est un système formé par un assemblage de macromolécules, c'est-à-dire un système d'entités de grande dimension, qui sont obtenues par la liaison covalente d'un grand nombre d'unités répétées, appelées monomères. La taille et la conformation des macromolécules sont contrôlées par le placement topologique de monomères (linéaires, ramifiées ...) et aussi par les interactions qui se développent entre chacune de ces monomères et le milieu environnant.

Polydimethylsiloxane (PDMS). PDMS également connu sous les noms diméthicone et l'huile méthylsilicone fait partie au classe siloxanes (R_2SiO) (Kuo, 1999). La formule chimique de PDMS est la suivante :



Où n est le nombre de répétition de monomère. Le polysiloxane possède des propriétés particulières grâce à sa structure moléculaire. Sa structure est simple, il est composé d'un squelette : alternance entre les atomes de silicium et d'oxygène, où les radicaux organiques (groupes méthyls) sont liés aux atomes de silicium (Figure 1.16). La chaîne polysiloxane a une grande flexibilité, grâce à un grand degré de liberté de rotation autour de la liaison Si-O. De plus la nature des liaisons covalentes Si-O du squelette est très stable, ce qui donne à ce polymère une stabilité thermique élevée. Son squelette inorganique est hydrophile, mais il porte des groupes organiques hydrophobe, ainsi le PDMS est hydrophobe. Il peut être sous trois formes, fluide (polymère linéaire à bas poids moléculaire), solide (polymère linéaire à haut poids moléculaire ou élastomère réticulé).

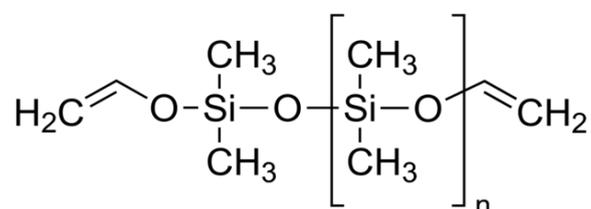


Figure 1.16 Molécule de Polydimethylsiloxane (PDMS)

(Sigma Aldrich)

Réticulation. Pour obtenir un solide élastomérique, il faut mélanger les chaînes de polymère avec un agent de réticulation et laisser cuire. Pour le PDMS et réticulant du kit Sylgard 184, le rapport recommandé par le fabricant est 10 pour 1, c'est-à-dire pour dix grammes de chaîne de PDMS il faut mettre un gramme d'agent réticulant, et ce ratio doit permettre la réticulation de la plupart des chaînes sans trop d'excès de réticulant. La rigidité, le module d'élasticité du PDMS dépend de son état de réticulation, de concentration du réticulant et du temps de la cuisson. La concentration d'agent réticulant peut également affecter les propriétés de surface, qui à leur tour peuvent avoir des conséquences sur la réponse cellulaire (Brown et al., 2004).

Le principal composant de l'agent réticulant sont des peroxydes, depuis des années quarante un certain nombre de types et de formulations de peroxyde ont été développés, qui sont thermiquement stables et efficace dans la réticulation. La réaction de réticulation consiste en décomposition des peroxydes en PDMS. Cependant, l'efficacité de chaque peroxyde dépend de sa température de décomposition du pourcentage d'oxygène actif. Généralement, plus le pourcentage de l'oxygène actif dans le peroxyde est élevé, moins il faut en rajouter aux chaînes de polymères. En fonction de type de peroxyde le processus de réticulation peut se faire de façons différentes. Le premier processus est fondé sur le fait que le peroxyde produit les radicaux polymériques, qui forment des liaisons carbone-carbone entre eux. Le deuxième processus est fondé sur le fait que le peroxyde extrait un hydrogène d'un méthyle du PDMS, par conséquent des groupes fonctionnels vinyle ($R-CH=CH_2$) sont créés dans la chaîne polymérique, ces derniers permet la réticulation du PDMS (Mani, 2011).

Avec la concentration de réticulant, le temps et la température jouent un rôle déterminant dans la réticulation, la rigidité du PDMS élastomérique obtenu en dépend (Fuard et al., 2008).

Viscoélasticité

Elasticité. (Figure 1.17B) L'élasticité est une propriété de matériau à revenir à son état initial après une déformation. Pour les matériaux linéaires (purement élastique), en considérant un bloc de surface S et de longueur initiale l_0 Hooke a énoncé une loi :

$$\sigma = \varepsilon E \quad (1.23)$$

Où σ est la contrainte $\sigma = \frac{F}{S}$ (avec F la force appliquée), ε est la déformation $\varepsilon = \frac{l-l_0}{l_0}$ (avec l longueur finale) et E le module d'Young. Le module de Young (E) décrit l'élasticité à la traction, ou la tendance d'un objet à se déformer le long d'un axe lorsque des forces opposées sont appliquées le long de cet axe même. Plus le module d'Young de matériaux est élevé, plus ce dernier est rigide (Landau, Théorie de l'élasticité, 1990).

Viscosité. (Figure 1.17D) Pour un liquide visqueux la loi énoncée par Newton est suivante :

$$\eta = \tau \frac{d\gamma}{dt} \quad (1.24)$$

Où η est la viscosité dynamique, τ la contrainte de cisaillement, γ la déformation et t le temps. Plus la viscosité est grande, plus l'écoulement est faible.

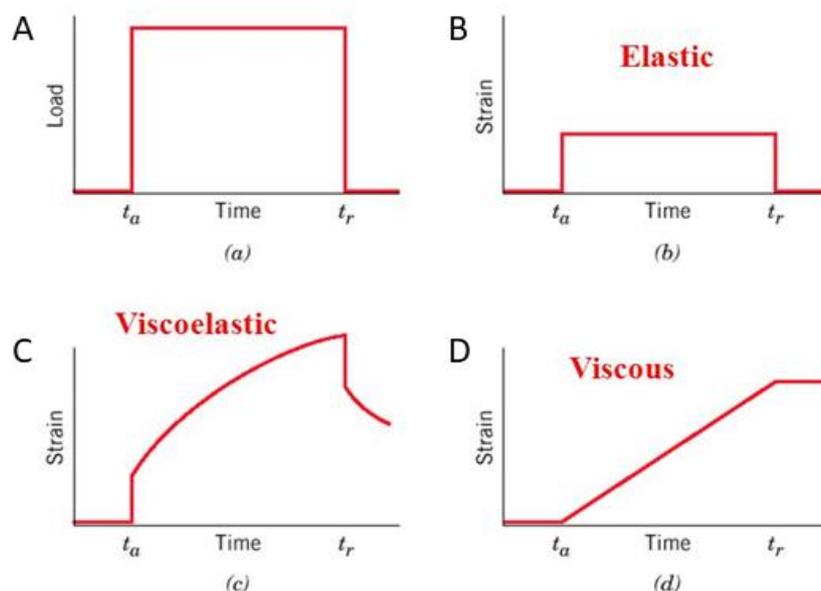


Figure 1.17 Profils déformation-temps

A) La contrainte est appliquée à t_a et est levée à t_r , B) Evolution de la déformation d'un matériau élastique linéaire C) Evolution de la déformation d'un matériau viscoélastique D) Evolution de la déformation d'un matériau visqueux. (Introduction to material science, University of Virginia)

Viscoélasticité. (Figure 1.17C) Le PDMS réticulé est un solide viscoélastique. Ce qui veut dire qu'aux temps long il est visqueux, alors qu'aux temps court il est élastique. Un solide purement élastique après avoir été déformé, dès que l'on enlève la traction il revient à sa forme initiale, grâce à l'énergie stockée. En revanche une liquide purement visqueux s'écoule de manière irréversible. Le temps caractéristique entre le comportement solide et le comportement liquide est le temps de relaxation (τ). La relation entre la viscosité (η), le module d'Young (E) et le temps de relaxation (τ) est donnée par : $\eta \sim E\tau$.

Pour les matériaux viscoélastiques, le module d'Young est plus complexe, que pour les matériaux purement élastiques. Il a deux composantes, une élastique, qui est l'énergie stockée pendant la déformation (partie réelle E') et une visqueuse, c'est l'énergie dissipée (partie imaginaire E''). Le rapport entre contrainte et déformation est un nombre complexe :

$$E^* = E' + iE'' \quad E = |E^*| \quad (1.25)$$

Module d'Young du PDMS. Il existe une différence significative dans le module élastique (E) du PDMS de différentes concentrations (Carrillo et al., 2005). D'après Wang et al., le module d'élasticité, E peut être exprimé en fonction du rapport PDMS/réticulant, n , par : $E \approx \frac{20}{n} MPa$. L'augmentation de la quantité d'agent de réticulation jusqu'à 20% rigidifie le réseau PDMS (Wang et al., 2014). Cependant, d'autres études montrent que pour les concentrations plus élevées de l'agent réticulant, le module est réduit, car les sites de réticulation sont saturés et l'excès de l'agent réticulant conduit à une dilution du réseau, réduisant ainsi la rigidité (Seo et al., 2013 ; Kim et al., 2011).

Le module d'Young et la résistance à la traction des échantillons réticulés à basse température sont indépendants du temps de cuisson. Alors que le PDMS réticulé aux températures plus élevées se caractérise par une résistance mécanique plus faible. La résistance mécanique réduite peut être expliquée par la décomposition thermique des chaînes polymériques qui commence à environ 200 ° C (Liu et al., 2009).

1.3.2 Propriétés mécaniques

Pour mon projet il est important de comprendre la mécanique d'indentation et de rupture (fracture) du PDMS afin d'expliquer et quantifier le phénomène et les forces d'invasion du pathogène *Candida albicans* dans un substrat en PDMS.

Forces entre molécules et énergie de surface. Entre deux surfaces en interaction, il peut y avoir plusieurs types d'interactions selon leurs propriétés, ces forces peuvent être par exemple : van der Waals, électrostatique, liaison hydrogène, hydrophobe, force d'hydratation, etc. L'énergie supplémentaire par unité de surface nécessaire pour former une surface d'un solide ou d'un liquide qui est en contact avec du gaz (ou dans le vide) est appelée l'énergie de surface γ (J / m^2). Elle s'exprime par :

$$\gamma \approx \frac{1}{2} \frac{k_B T}{a^2} \quad (1.26)$$

Où $\frac{1}{2} k_B T$ est le surcoût énergétique venant des molécules à la surface qui sont en contact avec moitié moins de voisines, et a^2 est la surface occupée par une seule molécule de surface (a longueur de liaison).

Energie libre de polymère. Les réseaux polymères, possèdent un désordre de type liquide au niveau moléculaire avec comportement hors équilibre, due à l'énergie cinétique moléculaire (énergie thermique), cependant à l'échelle macroscopique, ils présentent une réponse mécanique élastique caractérisée par de grandes déformations à de petites contraintes et une relation non linéaire entre la contrainte et la déformation. La force résistive à la déformation dans les matériaux solides est liée au changement d'énergie libre du matériau lors de la déformation. Dans la plupart des solides élastiques, le changement d'énergie libre est le résultat d'une augmentation de l'énergie interne due aux déplacements des atomes ou des molécules de leur positions d'équilibre. Le réseau de polymères de PDMS est constitué de nombreuses chaînes moléculaires réunies dans un maillage par des liaisons réticulées, qui peuvent adopter plusieurs conformations entre les points de réticulations. L'énergie libre associée à cette entropie conformationnelle conduit à une force de rappel élastique dans ces systèmes.

Pour une seule chaîne de polymère entre deux points de réticulations séparés par la distance a , l'énergie libre γ (J), s'exprime :

$$\gamma = \frac{3k_B T a^2}{2a_0^2} \quad (1.27)$$

Où k_B est la constante de Boltzmann, T est la température absolue et a_0 est la longueur de la chaîne non réticulée. (Fakhouri, 2015 ; Rubenstein et Colby, 2003).

Plusieurs modèles théoriques de la mécanique des contacts de deux surfaces élastiques ont été établis depuis le 19^{ème} siècle, ces théories ont pour l'objectif d'expliquer des déformations de surface, de la distribution des contraintes et de la force de l'adhésion entre deux surfaces en contact et d'en déduire les propriétés tel que le module d'Young et l'adhésion.

Pour la suite de ma thèse le contact entre un solide rigide (indenteur) et un demi-espace élastique (réseau de polymères réticulés) sera considéré (Figure 1.18).

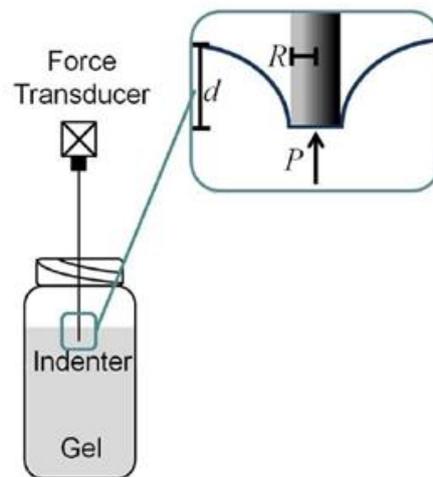


Figure 1.18 Schéma du dispositif d'indentation

Représentation du déplacement de l'indenteur vertical. Le zoom pour établir les définitions clés : rayon R , profondeur d et charge P (F dans le texte). (Fakhouri et al., 2015)

Modèle de Hertz. En 1882 Hertz a résolu le problème de contact entre deux solides élastiques (Hertz, 1882). Les analyses d'indentation traditionnelles sont basées sur le modèle de contact de Hertz, applicable aux matériaux élastiques linéaires subissant des déformations infinitésimales. Le modèle classique de Hertz est un modèle de contact qui ne prend pas en compte les interactions adhésives (Gupta et al., 2007 ; Liao et al., 2010). Selon le modèle de Hertz, pour l'indentation d'un substrat par un indenteur sphérique rigide, le module d'élasticité du substrat peut être obtenu à partir des courbes de force-déplacement d'indentation comme suit :

$$E_H = \sqrt{\frac{S^3(1-\nu^2)^2}{6RP}} \quad (1.28)$$

Où E_H est le module élastique et ν est le coefficient de Poisson du substrat, R est le rayon de courbure nominal de la pointe d'indenteur, P est la force appliquée, et S est la rigidité du

matériau ($S = dP / dh$, avec h la profondeur d'indentation). Ce modèle est valide si les forces adhésives entre l'indenteur et le substrat sont bien inférieures à la force de compression appliquée. Plusieurs modèles de mécanique de contact incluant l'adhésion ont été proposés (Carrillo et al., 2005).

Modèle de Johnson-Kendall-Roberts (JKR). Le modèle Johnson, Kendall, Roberts (JKR), tient compte des forces d'adhésion et il est le modèle d'adhésion le mieux adapté pour les indentations effectuées avec des sondes sphériques avec un grand rayon de courbure (Gupta et al., 2007).

$$E_{JKR} = \sqrt{\frac{S^3(1-\nu^2)^2}{6R} \left[\left(3 \frac{2}{\sqrt{1 + \frac{P}{F_A}}} + 1 \right)^3 \frac{1}{P + 2F_A + 2F_A \sqrt{1 + \frac{P}{F_A}}} \right]} \quad (1.29)$$

Où F_A est la force d'adhésion qui elle-même selon le modèle JKR s'exprime par :

$$F_A = \frac{3}{2} \pi R w_A \quad (1.30)$$

Où w_A est le travail d'adhésion par unité de surface de contact. Selon Johnson, w_A est le travail nécessaire pour séparer deux surfaces, telles que la pointe et la surface d'élastomère (Carrillo et al., 2005). Il faut noter que la théorie JKR ne tient compte des forces d'adhésion que dans la zone de contact.

L'étude de Carrillo et al. (Carrillo et al., 2005) a montré que les valeurs du module d'élasticité du PDMS calculées à partir d'expériences de nanoindentation utilisant un modèle de contact hertzien sont plus élevées par rapport aux résultats de compression (échantillon de PDMS comprimé entre deux plaques) (Figure 1.19).

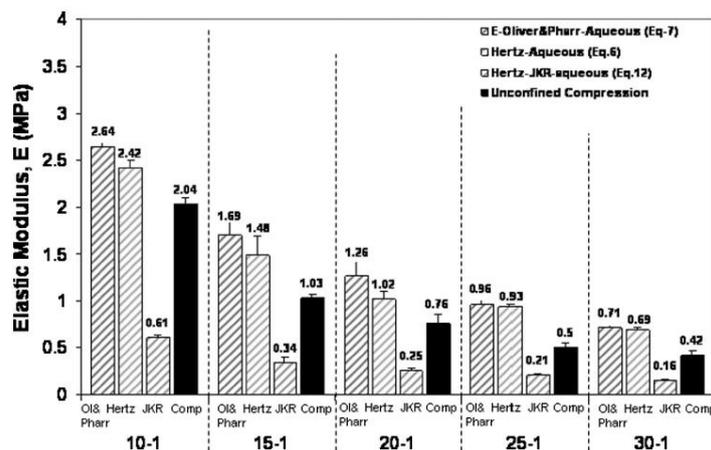


Figure 1.19 Modules élastiques de PDMS par nanoindentation

Modules élastiques obtenus à partir des expériences de nanoindentation à l'aide des modèles Oliver et Pharr, Hertz et JKR (de gauche à droite). À titre de comparaison, les résultats des modules élastiques de compression non confinés sont également indiqués pour chaque concentration de PDMS. (Carrillo et al., 2005)

Ces données indiquent que la surface de contact est beaucoup plus grande que celle estimée avec le modèle hertzien. De plus, lorsque les expériences sont effectuées dans un milieu aqueux, le module élastique est plus faible, mais ces valeurs restent plus élevées que les mesures de compression. Ce comportement peut être expliqué par une diminution du travail d'adhésion, l'attraction électrostatique est diminuée entre l'indenteur et l'élastomère à cause des molécules d'eau. Par conséquent, le travail d'adhésion ne doit pas être négligé et joue un rôle important dans la mécanique du contact du PDMS (Carrillo et al., 2005 ; Gupta et al., 2006).

Modèle Néohookéen. Quand une déformation est appliquée à un réseau de polymère réticulé, on peut décomposer le vecteur \vec{a} (distance entre les points réticulés sur une même chaîne) par les étirements λ_1 , λ_2 et λ_3 , de sorte que le changement d'énergie libre totale soit :

$$\Delta\gamma = \frac{3N k_B T (\vec{a}_1^2 (\lambda_1 - 1) + \vec{a}_2^2 (\lambda_2 - 1) + \pi_3^2 (\lambda_3 - 1))}{2\vec{a}_0^2} \quad (1.31)$$

Où N est le nombre total de chaînes polymères dans le système. La formule de la variation de l'énergie libre totale, selon le modèle néo-hookéen établi par Rivlin a été établie avec l'hypothèse que $a = a_0$ quand le réseau a été formé et s'écrit :

$$\Delta\gamma = \frac{3N k_B T}{2} (\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 - 3) \quad (1.32)$$

(Rubenstein and Colby, 2003 ; Fischer-Cripps, 2007).

Mécanique d'indentations profondes

Le profil de force avant la perforation est universel pour les différents matériaux viscoélastiques (Fakouri et al., 2015), plus précisément, plus l'indentation est profonde plus la force est élevée. À faible profondeur, la force en fonction du déplacement s'exprime par :

$$F \sim \frac{8}{3} ERd \quad (1.33 a)$$

$$F \sim \frac{16}{9} ER^{\frac{3}{2}} d^{\frac{1}{2}} \quad (1.33 b)$$

Pour une indentation avec une pointe plate (Eq. 1.33a) et sphérique (Eq. 1.33b), où F est la force appliquée par l'indentation, E est le module d'Young du matériau et R est le rayon de la tige d'indentation. À grande profondeur, la force varie en fonction du second ordre de la profondeur. Dans ces conditions, les contraintes nominale (σ_{zN}) et réelle (σ_{zR}), c'est-à-dire le rapport de la force et de la surface initiale ou de la surface réelle, dans un matériau Néo-Hookéen incompressible, obéissent aux expressions suivantes :

$$\sigma_{zN} = \frac{E}{3} \left(\lambda_z^2 - \frac{1}{\lambda_z} \right) \quad (1.34)$$

$$\sigma_{zR} = \frac{E}{3} \left(\lambda_z - \frac{1}{\lambda_z^2} \right) \quad (1.35)$$

Dans ce cas, l'étirement, λ_z , est défini comme le rapport de la hauteur déformée à la hauteur non déformée, L / L_0 (Fakhouri et al., 2015).

Suivant Fakhouri et al. 2015 ce modèle Néo-Hookéen peut être utilisé pour décrire des expériences d'indentation profonde, mais en redéfinissant l'étirement. Lorsque l'élastomère sous la tige est comprimé, il se déforme sur les côtés et s'élargi (orthogonalement à la compression) de telle sorte que sa dimension radiale augmente de kd , avec k une constante et d la profondeur d'indentation. Ainsi, l'étirement peut être définis comme :

$$\lambda_z = \left(\frac{R}{R + kd} \right)^2 \quad (1.36)$$

$$\lambda_r = \frac{R + kd}{R} \quad (1.37)$$

Donc, $\lambda_r^2 = \frac{1}{\lambda_z}$, en remplaçant dans l'équation σ_{zN} la contrainte devient :

$$\sigma_z = \frac{E}{3} (\lambda_z^2 - \lambda_r^2) \quad (1.38)$$

$$\sigma_z = \frac{E}{3} \left(\left(\frac{R}{R + kd} \right)^4 - \left(\frac{R + kd}{R} \right)^2 \right) \quad (1.39)$$

Pour exprimer la force F en fonction de la profondeur d , cette équation doit être multipliée par R^2 . Après simplification et l'élimination des termes d'ordre supérieur, la force appliquée pendant une indentation profonde obtenue par Fakhouri est :

$$F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' E R d \quad (1.40)$$

Où k' et k'' sont des constantes liées à k . Le terme linéaire de cette équation représente le contact (d'une pointe plate) à faible profondeur, on peut donc en déduire que $k'' = \frac{8}{3}$ (Fakhouri et al., 2015 ; Zheng et al., 2017 ; Rattan et al., 2018).

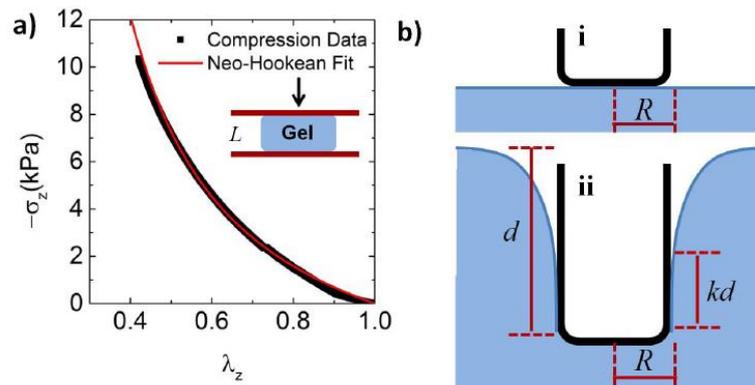


Figure 1.20 Compression et indentation

a) Données de compression uniaxiale avec equation 1.35. (d) Schéma d'approximation de déformation pour une indentation profonde par un indenteur. On considère qu'un volume cylindrique de gel sous la pointe d'indentation (i) a un rayon initial R égal à celui de la pointe et (ii) un rayon étiré $R + kd$, un multiple de la profondeur d'indentation. (Fakhouri et al., 2015)

Rupture et Fracture

Rupture. Quand la contrainte appliquée à un matériau atteint une valeur seuil la rupture est initiée. La mécanique de la fracture s'intéresse à l'initiation de la fissure et à sa propagation. Les trois classes de rupture sont : 1) Rupture fragile, qui caractérise les matériaux linéaires avec la propagation de fissure rapide. 2) Rupture par fatigue, qui correspond à une propagation de fissure très lente. 3) Rupture ductile, qui caractérise les matériaux dissipant beaucoup d'énergie, la propagation de fissure est lente (Persson et al., 2005). On s'intéressera à ce dernier comme le polymère dissipe beaucoup d'énergie (Figure 1.21).

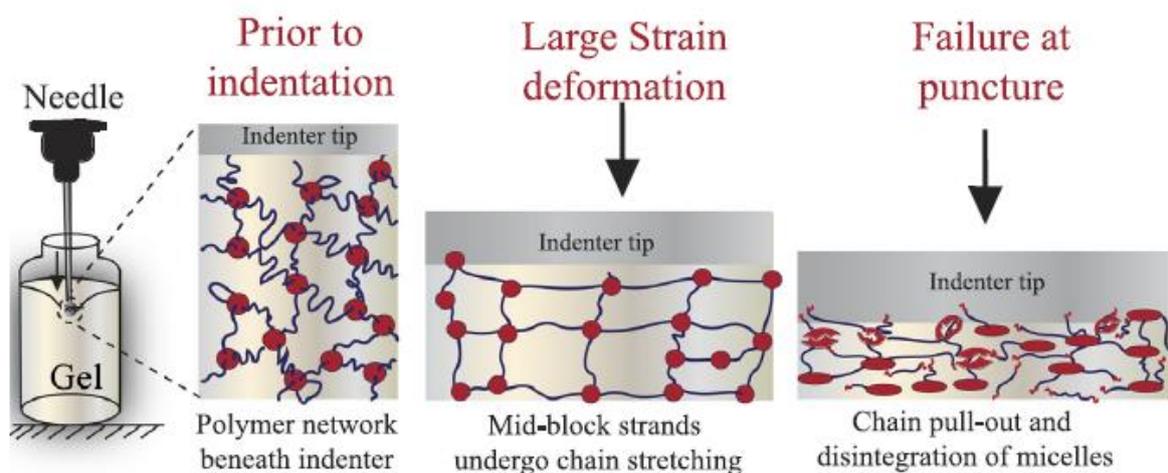


Figure 1.21 Indentation et initiation de fracture

Schéma de l'évolution d'un réseau de gel sous la pointe de l'indentation lors d'une grande déformation avant et au point de la rupture. La figure n'est pas à l'échelle. (Rattan and Crosby, 2018)

Energie de fracture. A partir des énergies de surfaces, on définit l'énergie de fracture Γ_A d'un matériau A par :

$$\Gamma_A = 2\gamma_A \quad (1.41)$$

Où γ_A est l'énergie de surface du matériau A. Dans le cas où le solide n'est pas pur, et est composé de deux matériaux, l'énergie de fracture s'exprime comme :

$$\Gamma_{A,B} = \gamma_A + \gamma_B \quad (1.42)$$

Avec γ_A et γ_B les énergies de surface du matériau A et B. Pour initier une fracture il faut que l'énergie apportée par la déformation soit supérieure à cette énergie requise.

Type de fracture classiques. En théorie de la fracture classique, on s'intéresse à la rupture selon des plans et trois types de fracture ont été identifiés (I, II, et III) selon la sollicitation : 1) séparation planaire orthogonalement à la fracture (type I), 2) cisaillement dans le plan de fracture (Type II) et 3) cisaillement orthogonalement au plan de fracture (type III). Ici nous considérons une situation originale à la géométrie de fracture n'est pas un plan.

Fracture induite par l'indentation d'une aiguille. Considérons l'indentation d'une aiguille dans un polymère (Nguyen et Vu-Khanh 2004 ; Nguyen et Vu-Khanh, 2009 ; Tayagui et al., 2017), la force augmente avec la profondeur d'indentation, jusqu'à ce que la force critique soit atteinte et la fracture soit initiée. Cet instant est caractérisé par une forte chute de force. La force critique à la rupture, F_c , est liée à la contrainte de nucléation critique ou à l'énergie de nucléation critique pour la formation de fractures. Selon Rattan (Rattan et al., 2018), l'énergie d'initiation de la fracture s'écrit :

$$\Gamma_0 = \frac{F_c}{R} \quad (1.43)$$

Pour qu'une fissure se forme, deux conditions doivent être remplies : (1) la contrainte dans le plan de la fracture doit être suffisamment élevée pour casser des liaisons chimiques, et (2) il doit y avoir suffisamment d'énergie dans le système pour séparer les interfaces correspondant à la fracture initiée. Le travail de séparation est défini comme la moitié du produit de la force critique, F_c , et du déplacement critique, d_c . L'énergie pour effectuer ce travail, U , par une surface A, doit être fournie par l'énergie, qui est contenue dans un volume fini de matériau, dans la zone appelé zone de processus de fracture (fracture process zone, FPZ), au voisinage de la surface de fissure. Une taille caractéristique de la FPZ, l_0 , peut être calculée en prenant l'énergie critique par zone (Γ_0 l'énergie de fracture) :

$$\frac{U}{A} = \Gamma_0 \quad (1.44)$$

Et en la divisant par la force critique par zone, σ_0 la contrainte de cohésion maximale :

$$\frac{F_c}{A} = \sigma_0 \quad (1.45)$$

Ainsi la taille caractéristique de la FPZ s'exprime par :

$$l_0 = \frac{\Gamma_0}{\sigma_0} \quad (1.46)$$

La taille caractéristique de la FPZ, l_0 , est une constante de matériau qui représente une transition entre les modes de fracture limitée par la contrainte et limitée par l'énergie. Autrement dit, le phénomène est limité par la contrainte si $l \geq l_0$, par définition le critère d'énergie aura déjà été satisfait, et la rupture se produirait lorsque la contrainte σ_0 est atteinte. Tandis que si la contrainte est concentrée dans une FPZ de taille $l < l_0$, la rupture ne peut se produire tant que la contrainte, σ , ne satisfait pas la condition $\sigma = \frac{\Gamma_0}{l} = \frac{\sigma_0 l_0}{l}$, c'est le cas à énergie limitée (Fakhouri et al., 2015).

Les mécanismes de rupture dans les solides viscoélastiques dépendent de la vitesse, ce qui s'explique par des processus de dissipation viscoélastiques, tels que i) le mouvement visqueux de chaînes polymériques, ii) la relaxation poroélastiques correspondant à la migration du solvant au sein du réseau, et iii) la cinétique de rupture de liaison à proximité de la région du front de fissure (Rattan et Crosby, 2018). L'énergie de fracture pour les matériaux réticulés, est également une fonction de la densité de réticulation et de la force de liaison des réticulations (Kundan et Ghatak, 2018).

Energie de propagation de fracture dans un matériau viscoélastique. Pour les matériaux viscoélastiques l'énergie de fracture Γ est une fonction de la vitesse de la propagation du front de fissure et de la température T :

$$\Gamma(v, T) = \Gamma_0 [1 + f(v, T)] \quad (1.47)$$

(Persson et al., 2005) où f tend vers 0, quand la vitesse de propagation v tend vers 0. Ainsi Γ_0 est la valeur minimale d'énergie requise, en-dessous laquelle la fracture ne peut se propager. La dissipation viscoélastique de l'énergie près de la fissure a deux contributions, la première se produit dans la zone de processus de fracture (FPZ) et est due à des processus non-linéaires, comme la rupture des liaisons chimiques, et les changements de conformation de polymère. Elle peut être décrit simplement par $\Gamma_0 = 2\gamma_0$, il faut noter que le γ_0 des matériaux viscoélastiques est plus élevé qu'une simple énergie de surface γ . La deuxième contribution à la dissipation a lieu devant le front de fissure, qui est représenté par $f(v, T)$ (Figure 1.22) :

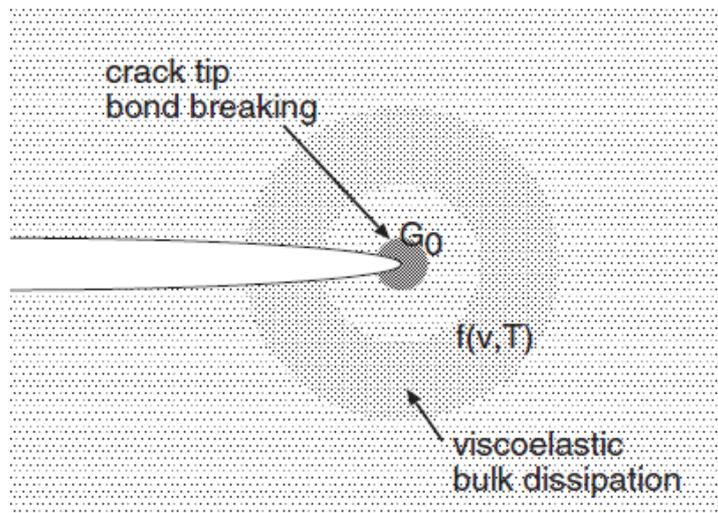


Figure 1.22 Energie de propagation de fissure G

L'énergie de propagation de fissure G est un produit d'un terme G_0 dérivé de la rupture de liaison au fond de fissure, et d'un terme $f(v, T)$ dérivé de la dissipation d'énergie viscoélastique en masse devant la pointe. (Persson et al., 2005)

La contrainte près de la fissure dans un matériau viscoélastique peut s'écrire sous la forme :

$$\sigma = K(2\pi r)^{-\frac{1}{2}} \quad (1.48)$$

(Persson et al., 2005) où K est le facteur de l'intensité de la contrainte, qui est dans le cas général proportionnel à la contrainte appliquée (comme par exemple la force appliquée par une sonde d'indentation), et r est la distance dans le matériau. Le taux de la déformation à une distance r depuis le front de fissure est caractérisé par une fréquence $\omega = v / r$, la fréquence la plus grande possible est v / a , où a est le diamètre atomique (la distance minimale possible). Persson considère deux cas (Persson et al., 2005) : le premier où la vitesse de propagation, v , est très petite et le deuxième où elle est très grande. Dans le premier cas la fréquence ω va tendre vers zéro, et dans ce cas le matériau aura un comportement purement élastique, avec un module $E_0 = E(0)$ et comme il n'y aura pas de dissipation l'énergie de la propagation de la fissure va être $\Gamma = \Gamma_0$. Dans le deuxième cas, pour des petits r , la fréquence, ω , va tendre vers infini, et la réponse sera dans la région vitreuse, avec le module E_∞ . Mais si r est suffisamment grand, la fréquence va correspondre à la zone viscoélastique, avec $E(\omega) \approx E_0$. La région dissipative avec $E(\omega)$ se trouve donc entre ces deux cas (E_0 et E_∞), représentée par la zone gris foncé sur la Figure 1.23 :

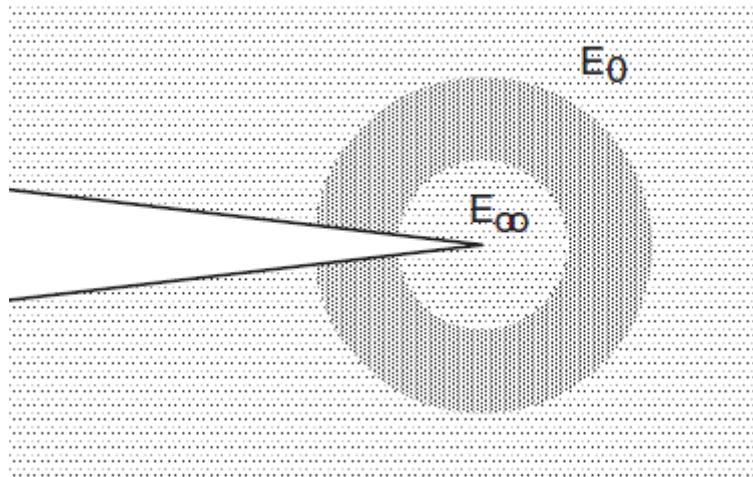


Figure 1.23 Zone de dissipation d'énergie viscoélastique (Persson et al., 2005)

L'énergie de la propagation de fracture est une fonction de K , le facteur d'intensité de la contrainte :

$$\Gamma = K^2/E \quad (1.49)$$

Dans la région près de fracture (r petit), où $\Gamma = \Gamma_0$ et $E = E_\infty$, cette expression devient :

$$\Gamma_0 = K^2/E_\infty \quad (1.50)$$

Quand seulement la région extérieure est observée, il faut inclure dans l'énergie de propagation de fissure la dissipation d'énergie dans la région de transition, de ce fait Γ ne serait pas supérieur à Γ_0 .

$$\Gamma = K^2/E_0 \quad (1.51)$$

En combinant les équations 1.50 et 1.51 on obtient :

$$\Gamma(\infty) = \Gamma_0 \frac{E_\infty}{E_0} \quad (1.52)$$

Pour des matériaux viscoélastiques E_∞ / E_0 est de l'ordre 10^3 , ce qui veut dire que devant le front de fissure se propageant à une grande vitesse la dissipation viscoélastique augmente considérablement l'énergie de propagation de fracture (Persson et al., 2005).

2. Matériels et méthodes

Le but de mon étude a été de mesurer les effets de la croissance de *C. albicans*, non pas dans un milieu liquide, mais dans un milieu solide mou qui mime les tissus humains. Ainsi ce milieu exerce, comme les tissus cellulaires, une force de résistance qui modifie les conditions de croissance des filaments. Cette démarche originale fait suite aux travaux de Minc et collaborateurs (2009) où une autre espèce de levures (*S. Pombe*) était mise dans des puits de PDMS et la mesure de la déformation du PDMS permettait de connaître la force résistive appliquée. Nous avons choisi de pousser plus loin et de voir si des hyphes de *C. albicans* pouvait non seulement déformer, mais aussi pénétrer dans des élastomères de PDMS. Nous avons choisi de partir de la même idée des puits dans lesquelles les cellules mère sédimentent et initient leur croissance.

Pour observer la croissance de *Candida albicans* dans les micro-puits de polydiméthylsiloxane (PDMS), un protocole de fabrication en plusieurs étapes a été établi ; il consiste à fabriquer un moule puis une membrane en PDMS, qui est ensuite traitée, avant ajout et incubation des cellules et observation microscopique. Pour les expériences analogiques de pénétration d'une tige macroscopique, un protocole de fabrication de gros échantillons a aussi été élaboré. Les différents échantillons de PDMS produits ont été caractérisés par analyse mécanique dynamique et indentation. Dans ce chapitre je vais aborder en détail, les protocoles et la mise en place des quantifications expérimentales.

2.1. *Candida albicans*

2.1.1. Culture cellulaire

Les souches de *C. albicans* sont conservées à -80°C. Pour utilisation, on inocule sur milieu gélosé riche, yeast extract peptone et 2% glucose (YEPD) additionné de 80µg/ml d'uridine (Uri) (Tableau 2.1).

Milieu	Composition pour 1L
YEPD	2.2% bacto-peptone, 1.1% Yeast extract, 2% agar, 2% glucose
Milieu sélectif (minimum – Ura)	900 ml LM2 (8 g Yeast Nitrogen Base, 55 mg adenine, 55 mg tyrosine), 100 ml 20% Glucose, 10 ml mélange acides aminés sauf uracile

Tableau 2.1 Composition du milieu

Après incubation 2 à 3 jours à 30°C, les colonies de *C. albicans* sont visibles. A partir de ces colonies, les cellules sont mises en croissance dans 5 ml de milieu liquide (YEPD + Uri) pendant une nuit à 30°C, puis diluées le lendemain dans le même milieu pour atteindre une densité optique (DO_{600nm}) de 0.1. L'incubation à 30°C est ensuite poursuivie jusqu'à une DO comprise entre 0.6 et 0.8, qui correspond à la phase exponentielle de croissance.

La croissance filamenteuse de *C. albicans* est induite en mélangeant un volume égal de cellules en phase exponentielle et de sérum de veau fœtal, suivi d'une incubation à 37°C.

2.1.2. Construction des souches

Le but étant de comparer la souche sauvage avec une souche mutée (mutant *rho1*), il faut que l'on puisse les distinguer. Une souche sauvage et la souche mutée exprimant une protéine de fusion fluorescente GFPctRac1 qui permet de visualiser la membrane plasmique (fluorophore vert) étaient d'ores et déjà générées. Nous avons choisi de marquer en plus le cytoplasme de la souche mutante *rho1* (PY2968) avec un fluorophore rouge, en exprimant mScarlet, ce marquage devant faciliter l'observation d'un éventuel phénomène de lyse cellulaire. Pour cribler les souches exprimant mScarlet, j'ai utilisé un marqueur d'auxotrophie. Une souche est auxotrophe lorsqu'elle présente une mutation qui rend impossible la synthèse d'acides aminés essentiels, tels l'histidine (His), l'uracile (Ura) ou l'arginine (Arg) ; elle ne peut croître que sur milieu qui contient cet acide aminé. On la rend prototrophe (capable de synthétiser les acides aminés His, Arg ou Ura) lors de la transformation en introduisant simultanément le gène exprimant mScarlet et un gène exprimant le marqueur d'auxotrophie ; les cellules ainsi transformées pourront alors croître sur milieu dépourvu de l'acide aminé essentiel.

La souche initiale (PY2968) hétérozygote pour *RHO1* (gène essentiel), dans laquelle un des deux allèles a été délété, et exprimant GFPctRac1, est auxotrophe pour Ura. J'ai donc transformé cette souche *rho1* avec un fragment d'ADN porteur du gène mScarlet sous contrôle du promoteur fort de l'alcool deshydrogénase (pADHmScarlet) et du gène permettant la synthèse d'Uracile. Ce fragment d'ADN s'intègre dans le génome par recombinaison homologue au locus de l'alcool deshydrogénase et le criblage des transformants s'effectue sur milieu ne contenant pas d'uridine.

La première étape a été d'amplifier le fragment d'ADN porteur des 2 gènes d'une taille approximative de 1kb, par PCR (réaction de polymérisation en chaîne). Pour un volume final de 500µl on mélange 333µl de H₂O, 100µl de tp Buffer5x, 25µl des oligonucléotides P1 et P2, 10µl de nucléotide dNTP (10mM), 2µl de plasmide pFAmScarletURA et 5µl de l'enzyme phusion et la PCR est initiée avec le programme suivant :

Les trois étapes essentielles pour chacun des 30 cycles sont : dénaturation (séparation des brins d'ADN), hybridation des amorces et élongation par action de la polymérase.

L'ADN est ensuite concentré par précipitation en rajoutant aux 250µl du mélange PCR 1ml d'isopropanol froid et 25µl de NH₄Ac (4M). On laisse cette solution dans la glace pendant 10 minutes, puis on centrifuge pendant 10 minutes à 4°C à une vitesse de 13000 tr/min. Le surnageant est aspiré et 500µl d'éthanol (70%) sont ajoutés au culot suivi d'une nouvelle centrifugation pendant 5 minutes. Le culot d'ADN est ensuite séché à 50°C pendant ~ 10 minutes, puis l'ADN est resuspendu dans 20µl H₂O MQ. 1 µl de la solution est mise à migrer sur gel d'agarose pour vérification.

La transformation est faite par électroporation, une méthode qui permet de déstabiliser les membranes cellulaires et laisser rentrer l'ADN par application d'un champ électrique. Une culture de cellules de *C. albicans* (PY2968) en phase stationnaire est diluée pour obtenir une densité optique comprise entre 1.6 et 2. Les cellules sont centrifugées à 4000

tr/min pendant 5 minutes, resuspendues dans 8ml d'H₂O, auxquels sont ajoutés 1ml de tampon 10XTE (100mM TrisHCl, 10mM EDTA, pH 7.5) et 1ml de Lithium Acétate (pH 7.5), et incubées pendant 45 minutes à 30°C. 250µl de dithiothreitol (DTT) 1M sont ensuite ajoutés avant une autre incubation de 15 minutes à 30°C, puis 40ml d'eau glacée avant centrifugation 3min à 3500 tr/min. Après aspiration du surnageant, le culot est resuspendu dans 25ml d'eau, recentrifugé, puis resuspendu dans 5ml de Sorbitol 1M glacé. Après une dernière centrifugation et aspiration du surnageant, le culot est resuspendu dans un volume final de 500 µl environ de Sorbitol. Une cuvette d'électroporation (QiaEXII), qui contient 40 µl de ces cellules et 10 µl de l'ADN concentré, est placée dans l'électroporateur à 1.8kV, avec des pulses de 4ms à 6ms. On ajoute ces cellules à 1ml de Sorbitol 1M, avant centrifugation 2 minutes à 2000 tr/min. Le culot cellulaire est finalement resuspendu dans 400µl de milieu salin LM2 et la suspension déposée sur milieu gélosé sélectif (-Ura) (Tab1) avant incubation à 30°C jusqu'à ce que les colonies de *C. albicans* apparaissent.

Pour criblage ~ 10 colonies sont sélectionnées pour être de nouveau étalées et remises en croissance sur un milieu sélectif -Ura, avec les contrôles appropriés (Figure 2.1). 10 colonies de la souche PY2968-mScarlet, nommée PY4956 et deux souches de contrôles sont étalées et remises en croissance sur un milieu sélectif -Ura.

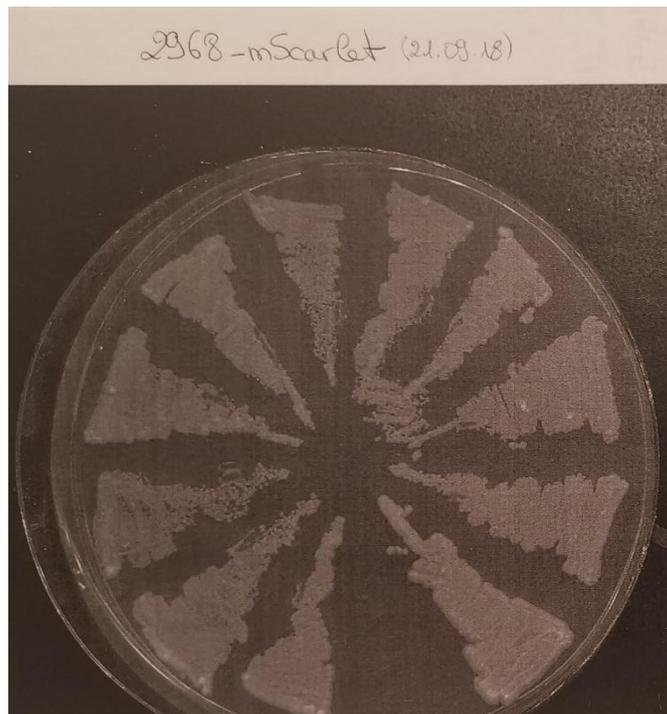


Figure 2.1 Croissance sur un milieu sélectif -Ura

S'ensuit une culture en milieu liquide puis une observation des cellules par microscopie de fluorescence. Les souches présentant un marquage rouge cytoplasmique et vert à la membrane plasmique sont sélectionnées et 1 ml de cellules additionnées d'1 ml de glycérol sont congelés pour conservation à -80°C. Ainsi j'ai obtenu une nouvelle souche PY4956, qui est identique à PY2968 mais exprimant mScarlet dans le cytoplasme.

2.2. Dispositif

La microfabrication a beaucoup à offrir à la microbiologie. La lithographie douce (soft lithography) permet de fabriquer des matériaux biocompatibles de dimensions correspondant à l'échelle des cellules. Les matériaux microfabriqués nous permettent d'isoler et d'étudier un grand nombre de cellules en parallèle, non seulement qualitativement, mais aussi quantitativement avec des données statistiquement significatives. La disponibilité de systèmes à microcanaux de presque n'importe quelle forme et complexité arbitraires permet d'explorer facilement comment les microorganismes perçoivent leur monde, et interagissent les uns avec les autres, à un nouveau niveau de détail physique. (Weibel et al., 2007)

2.2.1. Photolithographie

Nous avons opté pour la méthode classique de photolithographie douce pour fabriquer les moules. Cette méthode est bien connue et est très largement utilisée, surtout dans le domaine de la microfluidique, pour étudier par exemple la motilité, la chimiotaxie, les mouvements des populations, la croissance des cellules, le travail mécanique produit par les cellules microbiennes etc. Cette méthode de microfabrication fait référence à un ensemble de techniques de création de microstructures basées sur l'impression et le moulage. Elle a été développée comme une alternative à la photolithographie et à la lithographie par faisceau d'électrons. La dénomination « douce » vient du fait qu'elle est basée sur l'utilisation d'un masque à motifs en polymère, pour mouler des matériaux, comme de la résine, des polymères, des gels et des monocouches organiques, plutôt que le silicium et le verre. (Weibel et al., 2007) Elle permet de micro fabriquer des motifs avec une très grande précision.

THICKNESS	SOFT BAKE TIME
microns	minutes @ 95°C
0.5 - 2	1
3 - 5	2
6 - 15	2 - 3
16 - 25	3 - 4
26 - 40	4 - 5

Tableau 2.2 Temps de pré cuisson de la résine

Temps nécessaire pour pré cuire la résine avant l'insolation dépend de l'épaisseur de la résine étalé sur une surface lisse. (MicroChem data sheet)

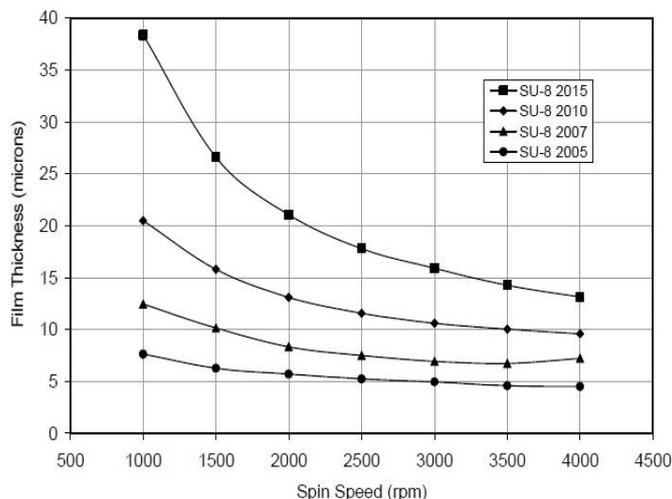


Figure 2.2 Epaisseur de la couche de la résine photosensible en fonction de la vitesse de rotation de la tournette (spin coater). (MicroChem data sheet)

La SU8-2015 est une résine photosensible négative, quand elle est exposée à la lumière ultraviolette, elle absorbe l'énergie et se rigidifie. La SU8-2015 est une résine visqueuse, faite naturellement pour des épaisseurs de 15 microns. Pour obtenir donc les plots de 5 μ m de hauteur, nous avons décidé de la diluer avec son solvant, la cyclopentanone (Figure 2.2). Ainsi 25g de résine SU8-2015 (Chimie Tech Services) est mélangée avec 16g de E-2-Méthylbut-2-énal, cyclopentanone C₅H₈O (Sigma-Aldrich). La viscosité de ce mélange permet d'obtenir une couche très fine par dépôt en spin coating (tournette). Un Wafer 3P (VWR) est préchauffé à 95°C pendant 3 minutes sur une plaque chauffante (VHP-C7, VWR Collection), puis nettoyé par un traitement plasma (Harrick Plasma Cleaner PDC-002-HPCE) pendant 1 minute à l'intensité maximale. Pour répartir la résine à sa surface et bien l'étaler, quelques gouttes du mélange est versé par-dessus le wafer, qui est fixé sur la machine Spin coater (WS-400B-6NPP_LITE, Laurell Technologies corporation), par succion d'air. La machine va tourner 5s à 200 rpm, puis 10s à 1500 rpm, et pour finir 40s à 3000 rpm. Ensuite le wafer est séché sur des plaques chauffantes (Ceramic Glass Hotplate, IKA et VHP-C7, VWR Collection) pendant 1 minute à 65°C et 2min à 95°C.

L'étape suivante consiste à attacher à la surface de la résine un masque en plastique, imprimé chez SELBA S.A. C'est ce masque qui me permet d'obtenir les motifs en résine (Figure 2.3). Le masque est négatif, c'est-à-dire, opaque avec des disques transparents, de 10 μ m de diamètre, espacés de 15 μ m sur une surface de 8mm*8mm. Quatre réseaux carrés de ces disques sont placés sur le masque avec 2cm de distance entre chaque.

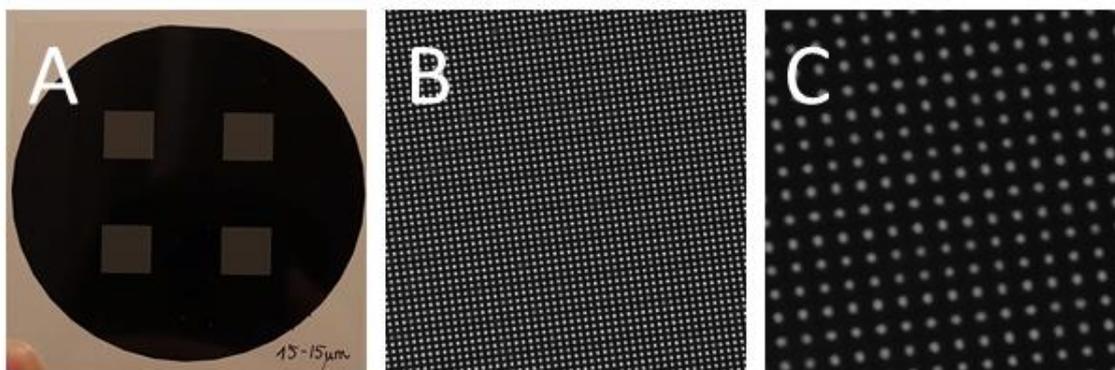


Figure 2.3 Masque

Masque négatif, opaque avec des points transparents, de $10\mu\text{m}$ de diamètre, espacés de $15\mu\text{m}$ sur une surface de $8\text{mm} \times 8\text{mm}$. Quatre tels carrés des points sont placés sur le masque avec 2cm de distance entre chaque. A) Vue d'ensemble B) X8 sur le motif C) X80.

Ensuite un « sandwich » wafer-résine-masque est exposé à de la lumière ultraviolette (lampe mercure 350 W, 66350, Newport) pendant 10s ($90\text{mJ}/\text{cm}^2$). Après l'insolation la résine nécessite de cuire. Pour ce, il est placé sur des plaques chauffantes pendant 1 minute à 65°C , puis 2min à 95°C . Ensuite, il faut enlever la résine non rigidifiée, pour ce, le wafer est plongé, dans du solvant Propylène Glycol Monométhyl Ether Acétate ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$, Sigma-Aldrich) pendant 3 minutes tout en agitant, ainsi la résine non insolée se dissout dans le solvant. Pour finir il est rincé avec de l'isopropanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$, VWR) et séché avec de l'air comprimé filtré (Figure 2.5).

Pour que le Polydimethylsiloxane (PDMS) n'adhère pas sur les plots de résine obtenue par la photolithographie et que le démoulage soit possible il faut silaniser le moule. Le moule (wafer avec des plots en résine) est préchauffé à 100°C et traité par le plasma pendant 1min est placé dans une boîte de Pétri (Greiner) avec 5g de silica gel préchauffé à 100°C et 3 gouttes de Silane (1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl-trichlorosilane ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{Cl}_3\text{F}_9\text{Si}$, Sigma-Aldrich). La boîte de Pétri est fermée hermétiquement et placée à 30°C pendant 30 minutes. Pour enlever le silane résiduel une couche sacrificielle de PDMS 10 :1 est cuite par-dessus le moule (Figure 2.4).

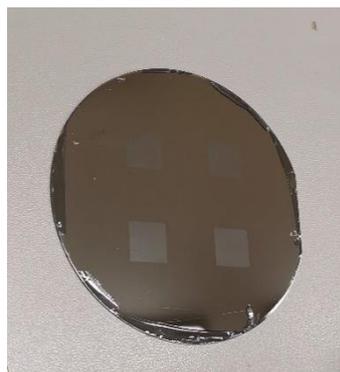


Figure 2.4 Image du moule

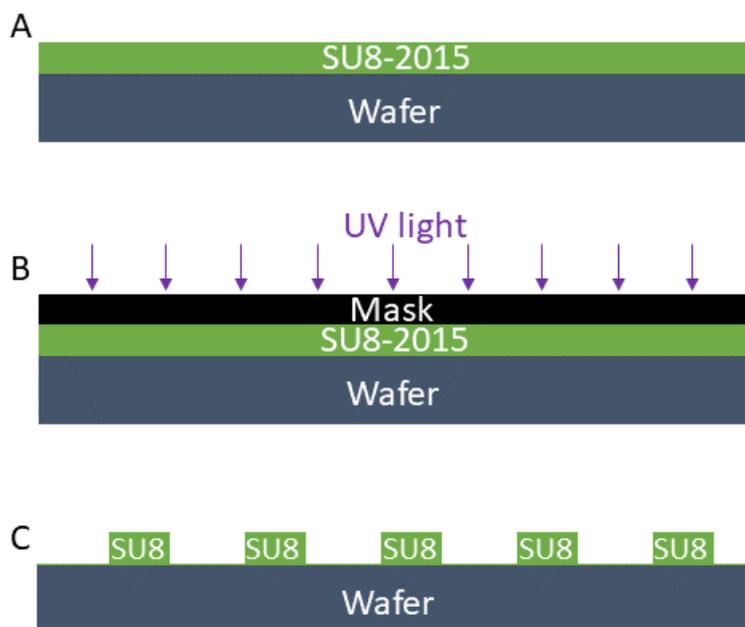


Figure 2.5 Photolithographie douce

A) La résine photosensible SU-2015 est étalée sur une pastille de silicium (wafer) B) Le masque est mis en place et la résine est insolée C) La résine non réticulée est lavée.

Des difficultés de photolithographie ont été rencontrées et surmontées. Elles venaient du fait que la résine avait vieilli et était devenu instable ou encore de l'inhomogénéité de la lampe UV. Au milieu de ma thèse j'ai substitué la résine le mélange SU8-2015 + cyclopentanone, par la résine SU8-2002. Cette dernière qui normalement est très peu visqueuse, était devenu plus visqueuse au cours du temps, ce qui m'a permis de l'utiliser et d'obtenir la hauteur des plots voulue. L'obtention de plots aux bords bien définis et verticaux ont requis de choisir une résine appropriée, Une grande attention doit également être portée sur les inhomogénéités de l'éclairage du substrat par la lampe UV.

2.2.2. Fabrication de la membrane en PDMS

Le kit Sylgard 184 (DOW CORNING) est constitué de chaînes de PDMS et de l'agent de durcissement, contenant des molécules de réticulation, a été utilisé. Les propriétés mécaniques dépendent du ratio de mélange des chaînes de PDMS et de l'agent réticulant, ainsi que la cuisson (durée, température). Le polydiméthylsiloxane (PDMS) a été choisi comme modèle pour cette étude en raison de ses propriétés optiques ($n = 1,41$), de sa non-toxicité et de sa gamme de modules élastiques (Xia et Whitesides, 1998 ; Minc, Methods in Cell Biology, 2014), il est aussi très largement utilisé dans les expériences de microfluidique (Weibel et al., 2007). Le fait qu'il n'est pas toxique permet de croître des cellules dessus sans altérer leur survie et leur taux de croissance, notamment *Candida albicans* (Thomson et al., 2014). Son indice de réfraction $n=1.41$ étant entre celles de l'eau $n_e=1.3$ et du verre $n_v=1.5$, permet d'observer et imager à travers le microscope sans aucun problème, comme les aberrations optiques. Ceci permet de croître les cellules sur des membranes de rigidités correspondants à celle de tissu cellulaire jusqu'aux implants médicaux.

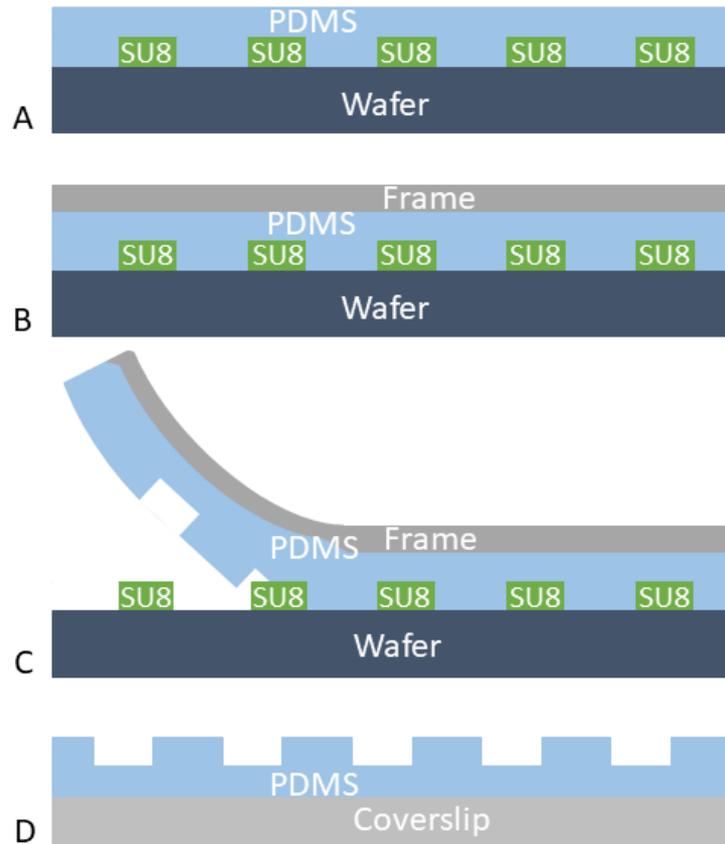


Figure 2.6 Fabrication de la membrane en PDMS

A) Le mélange PDMS-agent réticulant est coulé sur le moule B) Après pré cuisson, le cadre (en PDMS 10:1) est collé par l'adhésion à la surface de PDMS C) Après la cuisson à 90°C pendant 2h la membrane est démoulé D) La membrane est posée sur une lamelle de verre.

Pour fabriquer des membranes (Figure 2.6), les chaînes de PDMS et l'agent réticulant ont été mélangés soigneusement à la main, dans des rapports de masses : 10:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 47:1 et 50:1. En plus du mélange de ratio voulu pour la membrane, un autre mélange 10:1 est fait, pour fabriquer un cadre rigide qui me permettra de démouler la membrane. Les mélanges sont dégazés dans une chambre à vide, pour éviter que les bulles d'air se retrouvent entre les plots du moule et le PDMS, qui fragiliserait la membrane et compliquerait le démoulage. 5 g de mélange pour la membrane sont coulés sur des moules préfabriqués (Figure 2.7), tournés 5s à 100 tr / min (pour pré-étaler), puis 50 s à 500 tr / min (Spin coater WS-400B-6NPP_LITE, Laurell Technologies corporation).

Le reste de mélange, approximativement 35g, et le mélange 10 :1 sont versés dans des boîtes de Pétri, pour une analyse mécanique dynamique *à posteriori*. Tous les échantillons ont été pré-réticulés au four (Memmert) pendant 1h à 60 ° C. A ce stade-là, les échantillons sont sortis de four pour découper le cadre et le coller sur la membrane pour permettre le démoulage. Pour ce, quatre carrés (20 mm x 20 mm), espacés l'un l'autre de 5mm, dans le 10:1, sont découpés et enlevés, j'appelle le cadre ce qu'il reste dans la boîte de Pétri (Figure 2.8).



Figure 2.7 Etalement du PDMS sur le moule

Le moule est fixé sur la machine Spin coater avec le vide et le mélange PDMS-réticulant est versé dessus.

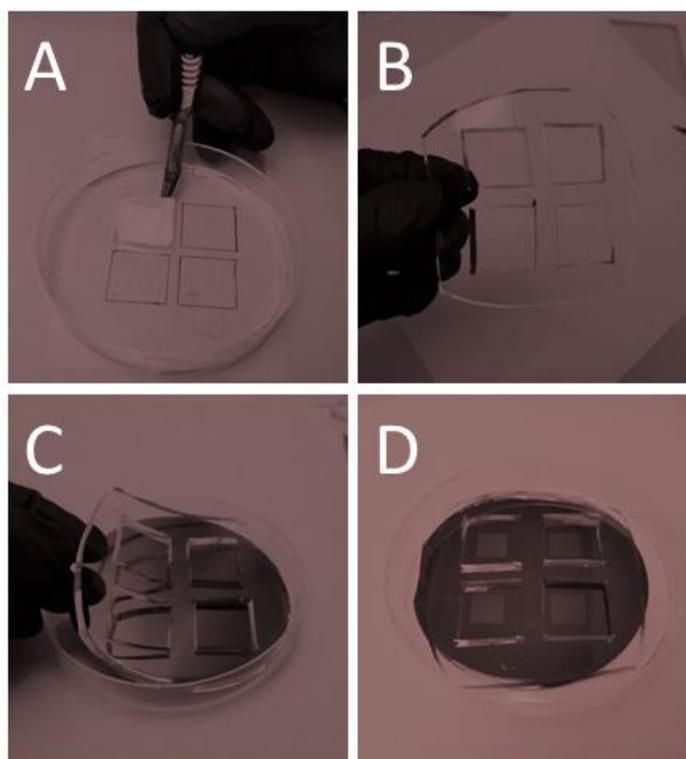


Figure 2.8 Découpage et collage du cadre

A) Découpage du cadre dans le PDMS 10 :1 coulé et réticulé dans une boîte de Pétri B) Le cadre C) Collage du cadre par adhésion sur le PDMS moulé D) Le PDMS moulé avec le cadre dessus.

Ensuite le cadre est placé sur le wafer par-dessus de la membrane. Comme au bout d'une heure les mélanges de PDMS ne sont pas complètement réticulés, le cadre se colle par adhésion sur la membrane, et ensuite la réticulation se poursuit et se termine à la surface de contact. Des bulles sont enlevées à la main en appuyant et les échantillons puis ceux-ci sont remis au four à 90°C pendant deux heures. Une fois que les échantillons refroidissent, la membrane est démoulée en tirant sur le cadre. Quand le cadre s'enlève la membrane le suit, c'est une étape très délicate, car la membrane est très fine, très élastique et fragile, peut se déchirer facilement. Il faut donc tirer assez pour surmonter l'élasticité de la membrane, mais pas trop pour ne pas la déchirer (Figure 2.9).



Figure 2.9 Démoulage de la membrane (En tirant délicatement le cadre se décolle du moule)

Une fois que la membrane est démoulée, il faut la mettre sur la lamelle de verre. D'un moule on obtient 4 membranes, donc il faut 4 lamelles de verre (18x18mmx170 μ m, VWR). Les lamelles doivent être nettoyées, pour optimiser l'adhésion de la membrane. Elles sont plongées dans l'éthanol et mises au bain ultrasons (Bransonic™ B200, Branson) pendant une trentaine de secondes, puis elles sont séchées avec de l'air comprimé, pour enlever toute poussière et finalement elles sont mises sur une plaque chauffante à 80°C. Le fait que les lamelles sont chauffées permet de déposer la membrane et d'adhérer rapidement, sans aucune bulle d'air entre membrane et lamelle. Pour que l'on puisse mettre le milieu de culture avec des cellules sur le PDMS, il faut que ce dernier soit hydrophile, alors que le PDMS est hydrophobe. C'est pour cela que j'oxyde les membranes avec un traitement plasma (Harrick Plasma Cleaner PDC-002-HPCE), afin de les rendre hydrophiles, pendant 14 secondes à faible niveau, puis je les plonge dans l'eau MQ pour maintenir l'hydrophilicité, qui autrement s'atténuerait en quelques jours (Figure 2.11 et Figure 2.10).

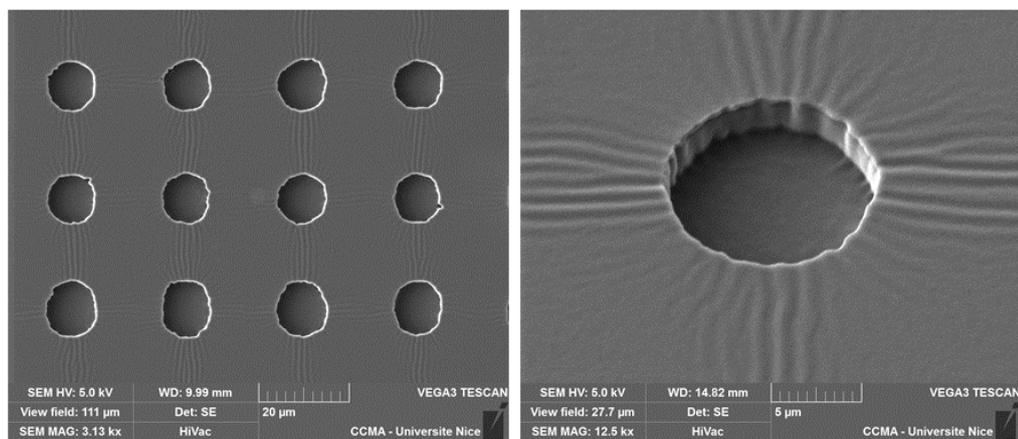


Figure 2.10 Image de la membrane par microscopie électronique (Y. Izmaylov)

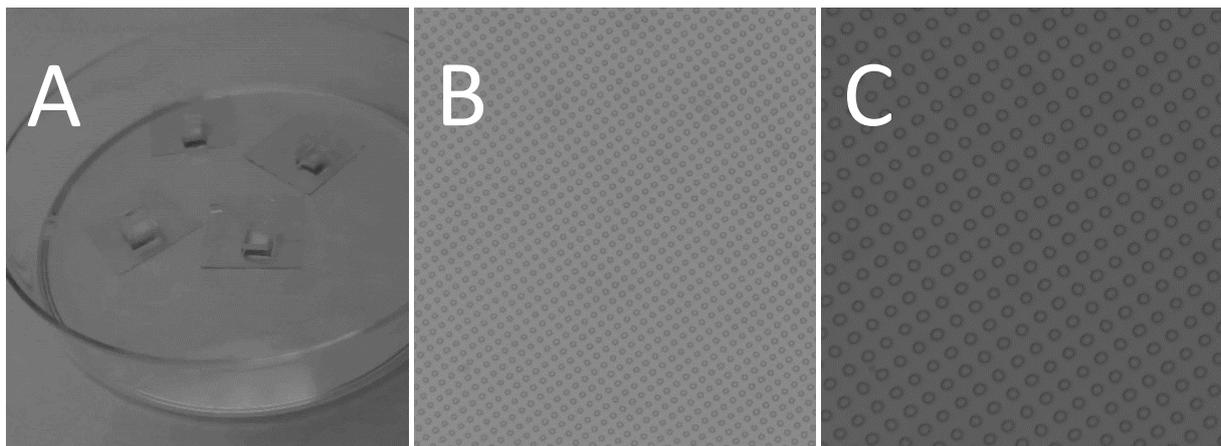


Figure 2.11 Membrane

A) Quatre membranes sur les lamelles de verre posées sur un piédestal en PDMS, B) image au microscope des puits avec grossissement x20 C) x70.

Pour optimiser la microfabrication, avant d'établir le protocole ci-dessus, plusieurs essais ont été conduits. Au début de ma thèse, j'avais des contraintes d'imagerie, la distance de travail des objectifs que l'on disposait était très faible, de $190\mu\text{m}$, de ce fait il fallait que les membranes soient beaucoup plus fines. Mais spin-coater à $1000\text{tr}/\text{min}$ rendrait la membrane très fragile, et donc le démoulage extrêmement difficile. Le rendement était donc très faible, 3 sur 8 membranes étaient utilisable en moyenne. Pour surmonter cette difficulté une membrane en double couche a été fabriquée. Ainsi, le ratio voulu a été étalé et réticulé complètement pour faire la membrane sur le moule, et ensuite une autre couche de 10 :1 a été mis par-dessus et recuit. Ainsi on pensait obtenir une membrane dont les puits auraient l'élasticité voulue pour observer l'invasion, mais avec la base rigidifiée par 10 :1 donc moins fragile. Mais dans les faits, le résultat a été différent, entre les deux couches les molécules de réticulation diffusaient et une membrane homogène plus rigide qu'attendu, où les hyphes de *C. albicans* n'arrivait pas à envahir a été obtenue. Le collage du cadre pour démoulage avait aussi été effectué avec plasma et non avec l'adhésion avant la réticulation complète. Cette méthode marche bien, mais pour éviter de vitrifier la membrane, il a été préféré de faire le collage avec l'adhésion. Une couche amorphe se forme avec le plasma, transformant le PDMS de surface en une couche rigide. Béfahy et al. 2009 ont mesuré les caractéristiques de cette couche vitrifiée, son épaisseur varie de 6 à 35 nm avec un module élastique de 1.5 GPa, soit de l'ordre de 1000 fois plus que le PDMS en masse.

Une fois que des objectifs de microscope avec une distance de travail plus élevée de $710\mu\text{m}$ ont été utilisés, il a été possible d'augmenter l'épaisseur de la membrane et par conséquent de faciliter le démoulage, donc augmenter le rendement. L'épaisseur de la lame et de la lamelle en verre étant respectivement de 1 mm et $170\mu\text{m}$, pour rester dans la fourchette où l'observation est possible il fallait que l'épaisseur de la membrane soit inférieure à $540\mu\text{m}$. L'épaisseur des membranes étalés à différentes vitesses ($600\text{tr}/\text{min}$ à $1800\text{tr}/\text{min}$) pour deux ratios extrêmes, 10:1 et 50:1 a été mesurée, par interférométrie avec un spectromètre USB (Oceanoptics). Grâce à un cadre de PDMS 10:1, un carré de la membrane ($1\text{cm}\times 1\text{cm}$) que je mettais en dessous du spectromètre a été découpé et démoulé. Le spectre visible (intensité - longueur d'onde) était enregistré, ce qui me permettait de remonter à l'épaisseur de l'échantillon par transformé de Fourier du spectre cannelé (Figure 2.12).

Le principe consiste au fait qu'une couche d'un matériau d'épaisseur d , est caractérisé par une interférence constructive : $N*\lambda = 2*n*d$. Où n est l'indice optique et λ la longueur d'onde. Si on trace le spectre en fonction de $1/\lambda$, nous avons un maximum périodique pour chaque $1/(2*n*d)$. Quand on prend la transformée de Fourier, un pic est présent à $2*n*d$, d'où la relation finale : $d = f/(2*n)$ où f est la fréquence dans le domaine de Fourier.

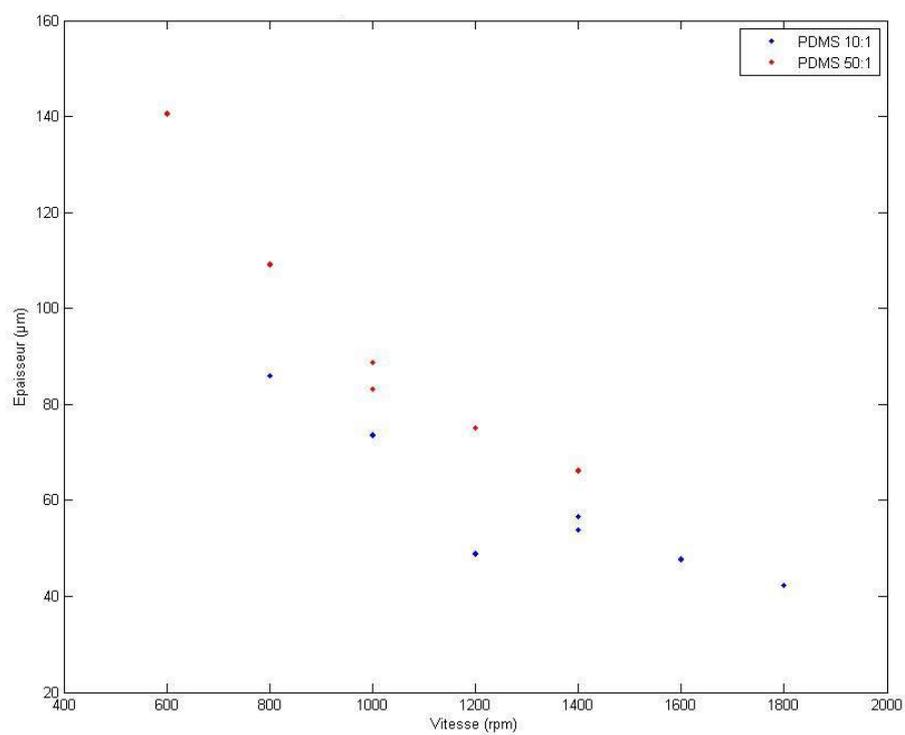


Figure 2.12 *Epaisseur de la membrane en fonction de la vitesse de rotation*

Etant donné que les différents ratios de PDMS n'ont pas la même viscosité, quand ils sont étalés à la même vitesse de rotation, l'épaisseur obtenue n'est pas la même.

2.3. Imagerie

2.3.1. Préparation de la membrane en PDMS

Avant dépôt des cellules sur le substrat PDMS, la membrane est lavée cinq fois avec de l'eau Milli-Q, séchée avec du diazote (N₂). 20 µl de Poly-D-Lysine (1 mg / ml), synthétisée chimiquement utilisée pour faciliter l'adhésion des cellules aux surfaces en plastique, en verre et en PDMS, sont déposés sur la membrane, qui est incubée à température ambiante pendant 20 min avant séchage avec du gaz N₂. L'adhésion cellulaire est très faible sur le PDMS non traité, en revanche elle est plus élevée sur les surfaces recouvertes de protéines associées à la matrice extracellulaire (Thomson et al., 2014). Puis 20µl de Concanavoline A (1/50) sont déposés sur la membrane, qui est de nouveau incubée à température ambiante pendant 20 min, avant séchage avec gaz N₂. La concanavoline A (conA) est une lectine végétale, qui a la capacité de se lier avec les résidus de mannose de plusieurs glycoprotéines et peut donc stimuler l'interaction avec la paroi cellulaire fongique.

Pendant ce temps, 1 ml de cellules de densité optique entre 0.6 et 0.8 sont lavées une fois avec de l'eau Milli-Q puis reconcentrées dans de l'eau Milli-Q à une DO approximative de 7, pour augmenter la probabilité que des cellules se déposent dans les puits de PDMS. 20 µl de ces cellules sont ajoutés à 90 µl de milieu d'induction de la croissance filamenteuse (375µl de sérum, 75µl de 4X LM2 et 50µl de glucose 10%), puis 3 µl de cette suspension sont déposés à la surface du PDMS. Une lamelle de microscope en verre (WVR) est enfin délicatement déposée sur le PDMS ainsi traité et le tout est mis à incuber à 37°C pendant 30 min (ou 1h selon l'expérience) avant microscopie.

2.3.2. Traitement à la caspofungine

La caspofungine est un agent antifongique de la classe des échinocandines. Chez *C. albicans*, la caspofungine agit en inhibant l'enzyme $\beta(1,3)$ -glucan synthase. Pour étudier l'effet de cet agent antifongique sur la croissance d'une souche sauvage, en surface et dans le PDMS, les cellules PY4594 (GFP-CtRac1; Δ /mScarlet-Sec4) sont mises en croissance pour la nuit dans un milieu contenant de la caspofungine à une concentration finale de 0.005µg/ml. Ces cellules sont ensuite diluées jusqu'à une DO de 0.1, remises en croissance à 30°C, dans un milieu contenant 0.005µg/ml de caspofungine jusqu'à une DO de 0.6 à 0.8. Avant dépôt sur la membrane en PDMS, les cellules sont resuspendues dans un milieu 375µl de FCS, 75µl de 4X LM2 et 50µl de glucose 10% avec 0.03µg/ml de caspofungine. Des cellules contrôles ayant été mises en croissance en parallèle en absence de caspofungine sont resuspendues dans le même milieu en absence de caspofungine.

Il a été montré qu'un traitement à la caspofungine à une concentration sub-MIC (minimal inhibitory concentration) résulte en une augmentation de la synthèse de chitine (Walker et al., 2008). Pour contrôler l'effet de la caspofungine, en parallèle de l'étude microscopique, j'ai induit la croissance filamenteuse des cellules dans un milieu liquide contenant du sérum, avec ou sans caspofungine 0.03µg/ml, puis fixé les cellules en présence de formaldéhyde (3.7 %) après différents temps d'incubation (30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 210 min), suivi de trois lavages dans un tampon Phosphate-buffered saline, PBS (1x pH 7.4). Les culots de cellules sont ensuite resuspendus dans 100µl d'eau auxquels on

ajoute 4 μ l de Calcofluor White (CFW), un fluorophore bleu qui se lie aux polymères polysaccharidiques incluant la chitine, à une concentration de 0.1875 mg/ml. Le CFW est ensuite visualisé par microscopie et l'intensité de signal quantifiée. J'ai utilisé différentes concentrations de caspofungine, 0.027 μ g/ml, 0.035 μ g/ml, 0.043 μ g/ml, 0.079 μ g/ml et 0.314 μ g/ml.

2.3.3. Microscopie

Pour mesurer la vitesse d'élongation du filament hyphal sur ou dans les membranes PDMS, j'ai utilisé un microscope confocal spinning disk, avec l'objectif UPLANAPO 1.2 NA 60 \times et le logiciel MetaMorph (Silva *et al.*, 2019). Je choisisais 20 positions où les cellules avaient commencé à pénétrer dans le PDMS, avec une profondeur du champ 8 μ m et un pas de 0.4 μ m, que j'imageais au moins pendant 3 heures, toutes les 10 minutes, avec des canaux DIC, fluorescence GFP, fluorescence mScarlet (5% laser, temps d'exposition 50ms).

Pour quantifier le taux d'invasion, j'utilisais le microscope de champ large et de fluorescence VideObserver, avec l'objectif Plan-Neofluar 0.75 NA 40 \times . Avec le logiciel MetaMorph je choisisais 20 à 30 positions au hasard avec une profondeur de champ de 7 μ m et un pas de 0.5 μ m, que j'imageais au moins pendant 3 heures, toutes les 10 minutes, avec des canaux DIC et fluorescence GFP (10% laser, temps d'exposition 70ms).

Pour mesurer l'intensité de signal du CFW, j'utilisais le microscope de champ large et de fluorescence VideObserver, avec l'objectif Plan-Neofluar 0.75 NA 40 \times . Avec le logiciel MetaMorph je choisisais des cellules au hasard avec une profondeur de champ de 10 μ m et un pas de 0.4 μ m, avec des canaux DIC et fluorescence DAPI (10% laser, temps d'exposition 70ms).

2.3.4. Analyse d'images

Les images des cellules ont été analysées avec FIJI. J'ai fait une projection des images sur le plan z, de telle sorte que les intensités de chaque plan soient additionnées. Pour la vitesse d'élongation du filament, j'ai mesuré la longueur initiale et finale du filament (n=10 cellules) et j'ai divisé par l'intervalle de temps. Pour quantifier le taux d'invasion, j'ai compté le nombre total des cellules, le nombre des cellules dans les puits, le nombre total de cellules invasives et le nombre de cellules invasives à partir des puits. Pour quantifier la proportion de chitine, j'ai pris la valeur moyenne de l'intensité du signal fluorescent de CFW de la cellule entière.

2.4. Caractérisation du PDMS

2.4.1. L'analyse mécanique dynamique

Pour caractériser l'élasticité du PDMS utilisé pour la membrane, le module d'Young des échantillons a été mesuré, avec la machine Viscoanalyseur DMA+452 (DMA3007000 MetraviB, Areva). Cette machine conduit une analyse mécanique dynamique, cela consiste à appliquer une contrainte ou une déformation oscillatoire, à faible amplitudes, et donc dans un régime linéaire, sur l'échantillon, et de mesurer la grandeur complémentaire. Grâce à un

logiciel, elle peut calculer, le module d'Young, le module de complaisance et le module d'élasticité isostatique. Le module d'Young représente la rigidité sous une compression axiale. Le module d'élasticité isostatique représente la compressibilité sous une compression isostatique, dans toutes les directions (x, y, z). La complaisance est l'inverse, donc représentée comme l'opposé du module d'Young. Tous les modules sont liés entre eux. Etant donné que dans les modèles de croissance viscoplastique du filament fongique, c'est le module d'Young qui apparaît, celui-ci est plus pertinent que d'autres modules pour la compréhension de l'invasion dans le PDMS.

En plus des échantillons correspondant aux membranes fabriquées, le module d'Young, ses composantes élastique et visqueuses ont été vérifiées pour une large gamme de ratios de PDMS. En variant l'amplitude de déformation ($5\ \mu\text{m}$ à $150\ \mu\text{m}$) et la fréquence de l'oscillation (0.3Hz à 10Hz). L'effet de temps sur le vieillissement de PDMS, et l'effet de l'eau sur le module d'Young, ont été également vérifiés. La mesure a été effectuée sur 9 échantillons de différents ratios, la moitié a été laissé à l'air libre, l'autre a été mis dans l'eau pure, 3 jours et 5 jours après le module d'Young a été remesuré, en variant l'amplitude de $5\ \mu\text{m}$ à $150\ \mu\text{m}$, à 10Hz .

Les mélanges de 40 g de PDMS ont été fait de la même manière que pour les membranes, puis ils ont été coulés dans des boîtes de pétri. Ensuite des carrés de PDMS de $20\text{mm} \times 20\text{mm}$ ont été découpé pour obtenir des échantillons convenables aux mesures par viscoanalyseur. La longueur, la largeur (l) et l'épaisseur (e) exacte de ces échantillons carrés ont été mesuré avec un pied à coulisse (Absolute AOS Digimatic, Mitutoyo). Les port-échantillons sont fixés sur la machine, et l'échantillon de PDMS est mis en place en alignant (Figure 2.13).

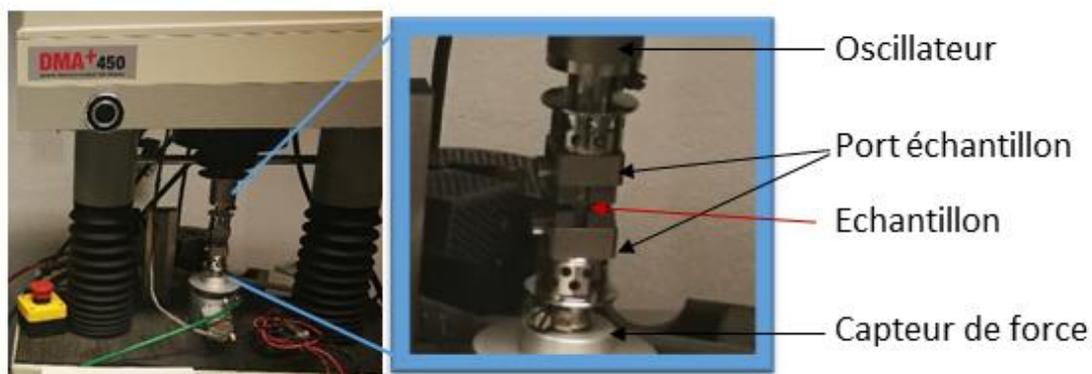


Figure 2.13 Set-up Viscoanalyseur

L'échantillon carré de PDMS est placé dans le port échantillon, qui est lui-même lié à l'oscillateur et au capteur de force.

Les données géométriques sont rentrées dans le logiciel Dynaset20, qui permet de lancer la mesure et obtenir le résultat des calculs également. La fréquence de l'oscillation et l'amplitude de la déformation voulues sont également indiquées et la mesure est lancée. Les données en sortie contiennent l'amplitude de déplacement (D) et sa grandeur complémentaire : la force (F), le module d'Young (E), ses composantes élastique (E') et visqueux (E'').

2.4.2. Indentation

Description de l'expérience

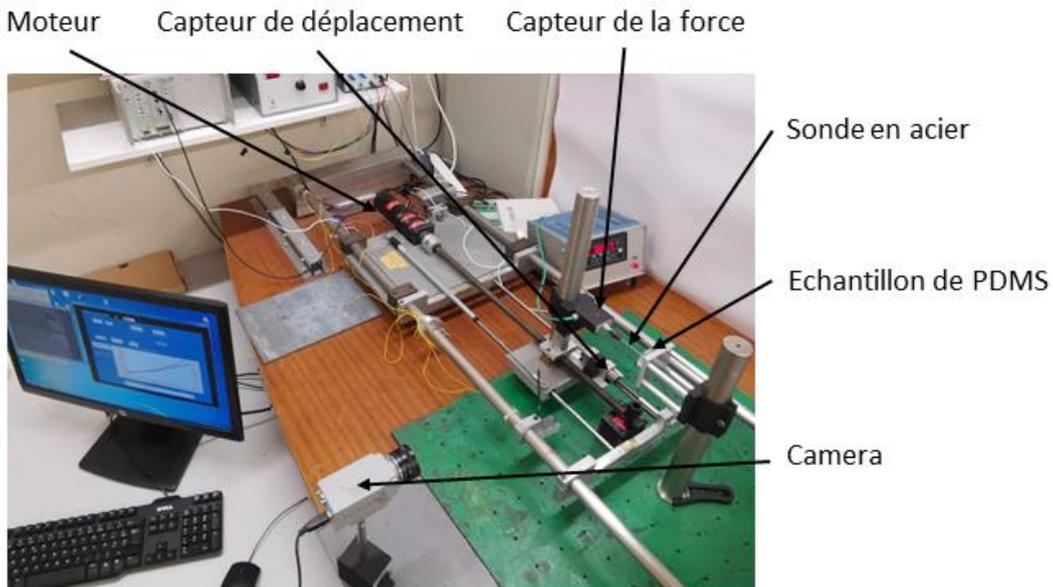


Figure 2.14 Vue de dessus sur le set-up de l'indentation

600g de PDMS est mélangé avec l'agent réticulant dans les proportions tel que l'on obtienne (10:1, 20:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1) avec un mélangeur (Ministar 20 digital, IKA) de 500 à 1000 tr/min pendant 3 à 5 minutes. Le mélange est dégazé dans une chambre à vide (ALCATEL rotary vane vacuum pump, MEDITECH SCIENTIFIQUE et Dessicator Nalgene, Thermo Scientific). Ensuite, le PDMS est versé dans des moules cylindriques en acier de deux tailles (8cm de diamètre et 2cm de hauteur ; et 3.5cmx1.75cm). Les 12 moules, 6 de chaque, que j'ai conçu et dessiné dans le logiciel FreeCAD, et fabriqués par l'atelier de mécanique du laboratoire, ont été utilisés. Le PDMS est réticulé au four, 1h à 60°C puis 2h à 90°C. Avant de les démouler ils sont laissés à refroidir à température ambiante. Pour trois cylindres de chaque taille, le fond du moule a été retiré de telle sorte qu'ils soient fixés sur leurs circonférences. Les moules ont été vissées sur un support en acier de tel sorte que l'axe du cylindre passant sur le centre soit horizontal. J'appellerai les échantillons $r_{\max}=R$, les blocs de PDMS sur lesquelles les mesures ont été faites dans ce cas-là (R le rayon au bord du cylindre), c'est-à-dire conditions aux bords fixe pour ce rayon. Les autres cylindres de PDMS ont été complètement démoulés et accolés par l'adhésion sur une plaque d'aluminium avec un trou de 5 mm de diamètre. J'appellerai les échantillons $x_{\max}=L$, les blocs de PDMS sur lesquelles les mesures ont été faites dans ce cas-là (L longueur du cylindre) (Figure 2.15 et Figure 2.16), c'est-à-dire conditions aux bords fixe en $x_{\max}=L$. L'axe du centre de PDMS était aligné avec une sonde en acier cylindrique de longueur plusieurs centimètre et dont le pointe est hémisphérique de 1 mm de diamètre. Celle-ci est reliée à un capteur de force 2daN (Kistler) et à un capteur de déplacement (Fastar Data Instruments). Cette sonde se déplaçait grâce à un plateau mobile, géré par le moteur (FS1000HP, Cerclat) (Figure 2.14). Le moteur lui-même étant géré par un

logiciel écrit en LabView, ForceD. Ce logiciel permet d'indiquer la vitesse de déplacement, et enregistre la force et le déplacement en fonction du temps.

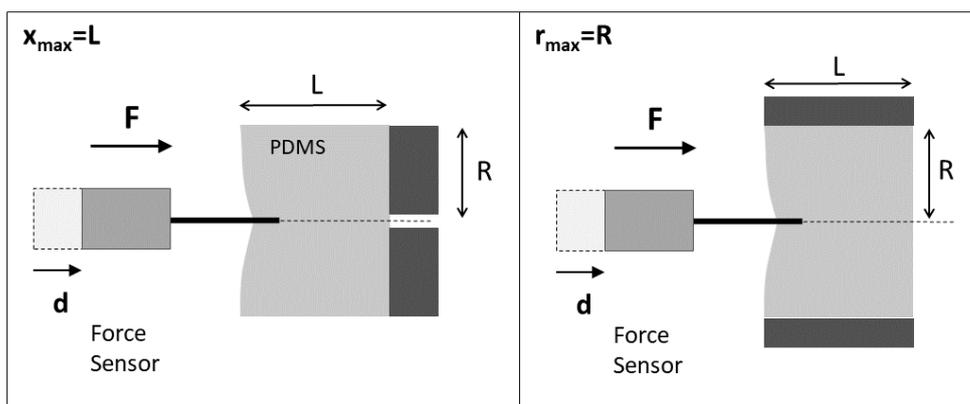


Figure 2.15 Schéma d'indentation/perforation dans les deux conditions aux bords $x_{\max}=L$ et $r_{\max}=R$

d est la distance parcourue par la sonde ; F est la force détectée par le capteur ; L est la longueur du PDMS et R est le rayon.

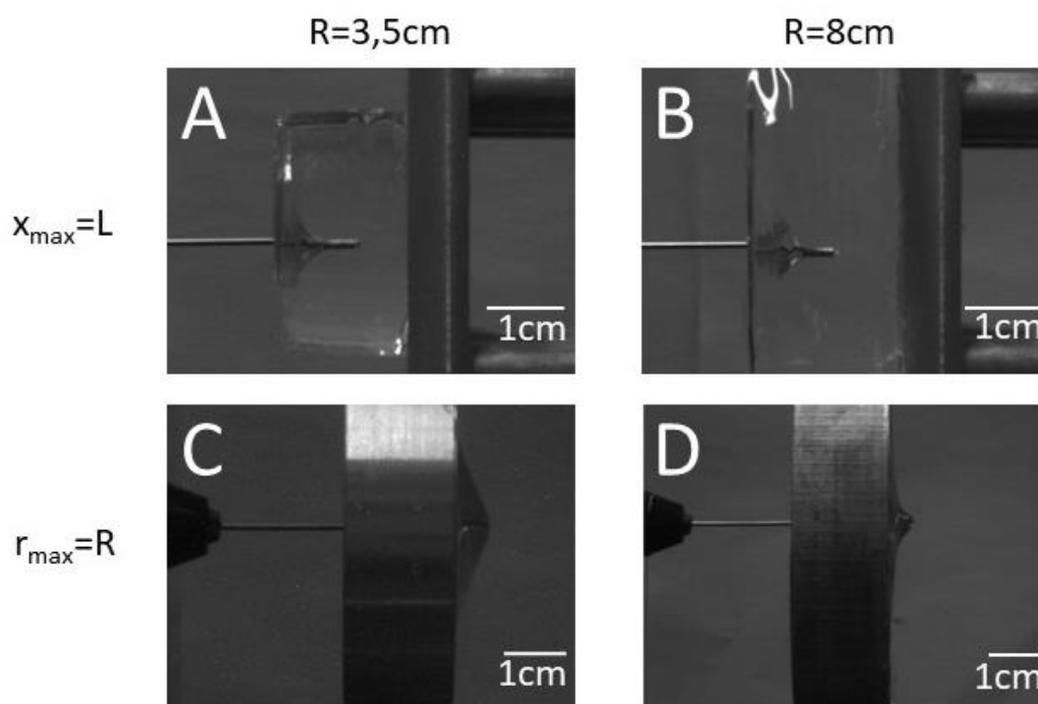


Figure 2.16 Les quatre conditions géométriques d'indentation

A) PDMS 40:1 de 3,5cm de diamètre et 1,75cm de longueur accolé à une plaque en dural B) PDMS 40:1 de 8cm de diamètre et 2cm de longueur accolé à une plaque en dural C) PDMS 40:1 de 3,5cm de diamètre et 1,75cm de longueur laissé dans l'anneau de son moule en dural D) PDMS 40:1 de 8cm de diamètre et 2cm de longueur laissé dans l'anneau de son moule en dural.

Calibrage des capteurs

Une expérience d'indentation nécessite des capteurs de déplacement et de force, qui nécessitent d'être calibrés. Le capteur de force (Kistler, XF 2daN N°66999) a été calibré de deux façons, en posant différents poids par-dessus et en les suspendant (Figure 2.17). Les courbes de force en fonction de la masse ont été tracées et il a été vérifié que la pente obtenue était bel et bien égale à la constante de l'accélération de la pesanteur $g=9.8\text{m/s}^2$.

La distance enregistrée par le capteur de déplacement (Fastar Data Instruments, FS1000HP) était exactement égale à la distance parcourue par ce dernier, qui a été mesuré par un pied à coulisse.

Comme dans le logiciel seule la tension à laquelle le moteur va tourner peut-être indiquée, pour accéder à la vitesse, il faut calculer la pente du déplacement en fonction du temps. La tension d'entrée a été alors variée et les vitesses de déplacements correspondantes ont été mesurées (Figure 2.18). Ainsi pour les expériences d'indentation on pouvait en déduire quelle tension il fallait appliquer pour déplacer la sonde dans la fourchette de vitesse voulue.

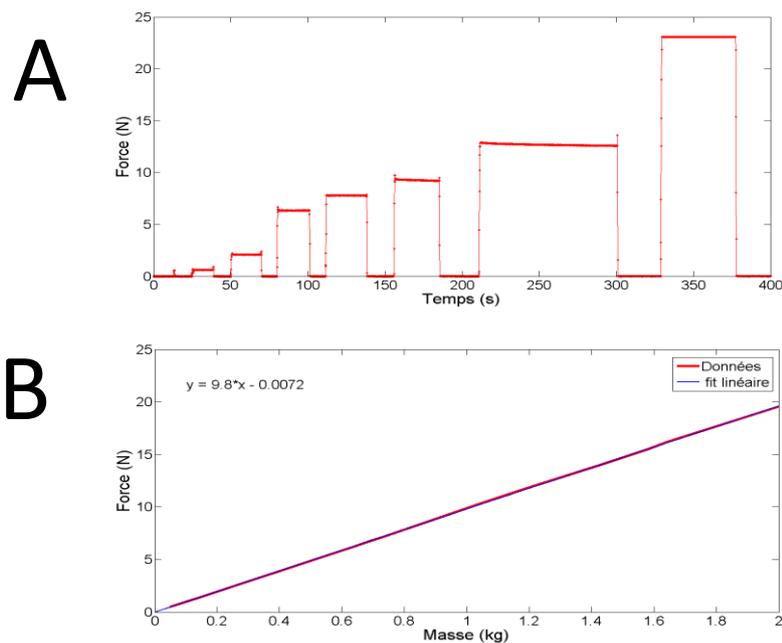


Figure 2.17 Calibrage du capteur de force 2daN

A) Variation de la force quand on pose les différents poids sur le capteur (respectivement 63.5g; 213.5g; 651g; 801g; 1119.5g; 1857g et 2551g) B) Force mesurée par le capteur de force en fonction de la masse posée sur lui. L'ajustement linéaire de celui-ci montre que la valeur du coefficient directeur est bien égal à la constante de l'accélération de la pesanteur $g=9,8\text{ m/s}^2$.

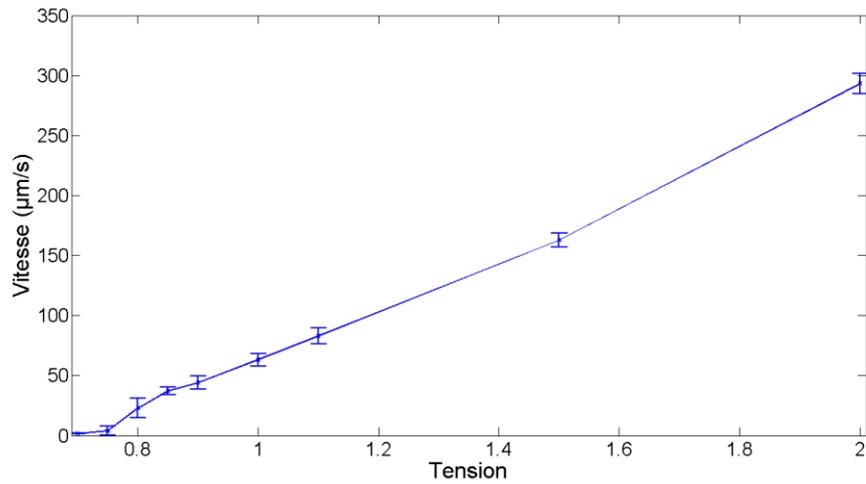


Figure 2.18 Vitesse du déplacement de la partie mobile en fonction de la tension rentrée dans le logiciel ForceD.

Le logiciel ForceD ne permet pas de directement contrôler la vitesse de déplacement. Une valeur de tension est indiquée dans le logiciel, et la vitesse est mesuré grâce à la courbe de déplacement en fonction du temps. Chaque point représente la moyenne de 2 à 70 mesures, et la barre d'erreur présentée est l'écart-type correspondant.

3. Résultats et discussions PDMS

Je présente dans ce chapitre les résultats obtenus pour les expériences d'indentation d'élastomère de PDMS par des tiges millimétriques qui conduisent à la perforation du PDMS. Ces expériences macroscopiques ont deux objectifs :

1) mieux comprendre la physique de la perforation, en particulier lorsque l'élément perforant traverse complètement l'échantillon. Nous présentons les résultats obtenus pour différents ratios du PDMS, de la vitesse de pénétration, des conditions aux bords s'appliquant sur l'échantillon.

2) se servir de cette expérience, analogique de l'invasion par *C. albicans*, pour pouvoir ensuite quantifier les forces subies par les filaments d'hyphes réelles et pouvoir mesurer ainsi la pression de turgescence qu'elles développent. Cette partie sera développée au chapitre suivant. Il s'agit de vérifier lors d'une croissance filamenteuse si les modèles existants (Minc et al. 2009) sont aussi capables de décrire ce mode de croissance. Dans le présent chapitre nous montrons comment on peut extraire les différentes composantes de la force appliquée sur la tige (Adhésion-friction / rupture).

Dans une première partie, nous exposons les données mesurées pour nos échantillons sur les propriétés mécaniques du PDMS. Puis nous exposons nos résultats obtenus avec l'expérience de perforation : ratio du PDMS, vitesse d'indentation, conditions aux bords.

3.1. Propriétés du PMDS utilisé

Dans un premier temps, à l'aide d'une machine qui permet de faire une analyse mécanique dynamique des échantillons, j'ai obtenu le module d'Young du PDMS réticulé aux différents ratios et j'ai évalué ses composantes élastique (partie réelle) et visqueuse (partie imaginaire).

3.1.1. Module d'Young : viscoélasticité

Composantes élastique et visqueuse en fonction de la fréquence et de l'amplitude d'oscillation

Comme décrit dans le chapitre matériels et méthodes, les différents échantillons de PDMS ont subi une déformation oscillatoire aux amplitudes et fréquences différentes. Le but étant de déterminer si on peut considérer PDMS purement élastique à l'échelle de *C. albicans* il aurait fallu appliquer une déformation de cet ordre. Etant donné que l'amplitude minimale A et la fréquence minimale f que la machine puisse appliquer sont de $5\mu\text{m}$ et 0.3Hz , respectivement, la vitesse minimale que je puisse appliquer est donc $v = Af = 90\mu\text{m}/\text{min}$, ce qui est bien supérieur à la valeur du taux d'élongation de *C. albicans* $0.3\mu\text{m}/\text{min}$. Mais grâce à une étude DMA on peut néanmoins en déduire si le PDMS est purement élastique à l'échelle de *C. albicans*, si pour des valeurs de vitesses de déformations plus élevées la composante visqueuse est négligeable et si la composante élastique est indépendante de la fréquence et de l'amplitude.

Pour ce qui est de la gamme d'amplitudes de vibrations appliquées (jusqu'à 100 microns), les résultats ont montré que ni les composantes élastique E' ou visqueuse E'' du module E ne dépendent de l'amplitude d'oscillation, dans la gamme étudiée, et cela, quel que soit le ratio du PDMS et la fréquence d'oscillation (Annexes : Figure 0.1 Figure 0.2 Figure 0.3 Figure 0.4 et Figure 0.5). L'appareil ne permettait pas dans ce mode oscillatoire d'explorer un domaine élargi d'amplitude.

A contrario, on observe une légère dépendance de ces modules avec la fréquence (Figure 3.1). Il faut noter que plus le PDMS est rigide plus la dépendance sur la fréquence est importante. Etant donnée que la dépendance du module visqueux E'' des élastomères PDMS correspondants aux rigidités utilisés pour les expériences de biologie (40:1, 30:1) sur la fréquence est très faible et croissante, on peut suggérer que à une déformation qui correspondrait à une vitesse de croissance de l'hyphe $v=0.3\mu\text{m}/\text{min}$ qu'il est négligeable. C'est à dire $E' \gg E''$ aux faibles fréquences (Annexes : Figure 0.6, Figure 0.7, Figure 0.8 et Figure 0.9). Pour illustrer que $E' \gg E''$, j'ai tracé sur la Figure 3.2, le rapport E'/E en fonction du ratio de PDMS pour trois couples amplitude-fréquence. Pour les PDMS rigides (5 :1 à 20 :1) on observe que ce rapport E'/E est très proches de 1 quel que soit la vitesse de déformation (la fréquence d'oscillation), ce qui veut dire que le PDMS de ces ratios peut être considérés comme purement élastique. Le rapport E'/E pour les ratios 30 :1 et 40 :1 dépendent de manière plus importante de la fréquence, pour la basse fréquence 0.3Hz il est proche de 1, et plus la fréquence augmente plus il diminue, et s'éloigne de 1, plus le PDMS est mou plus cet écart est important et donc plus la partie visqueuse est importante.

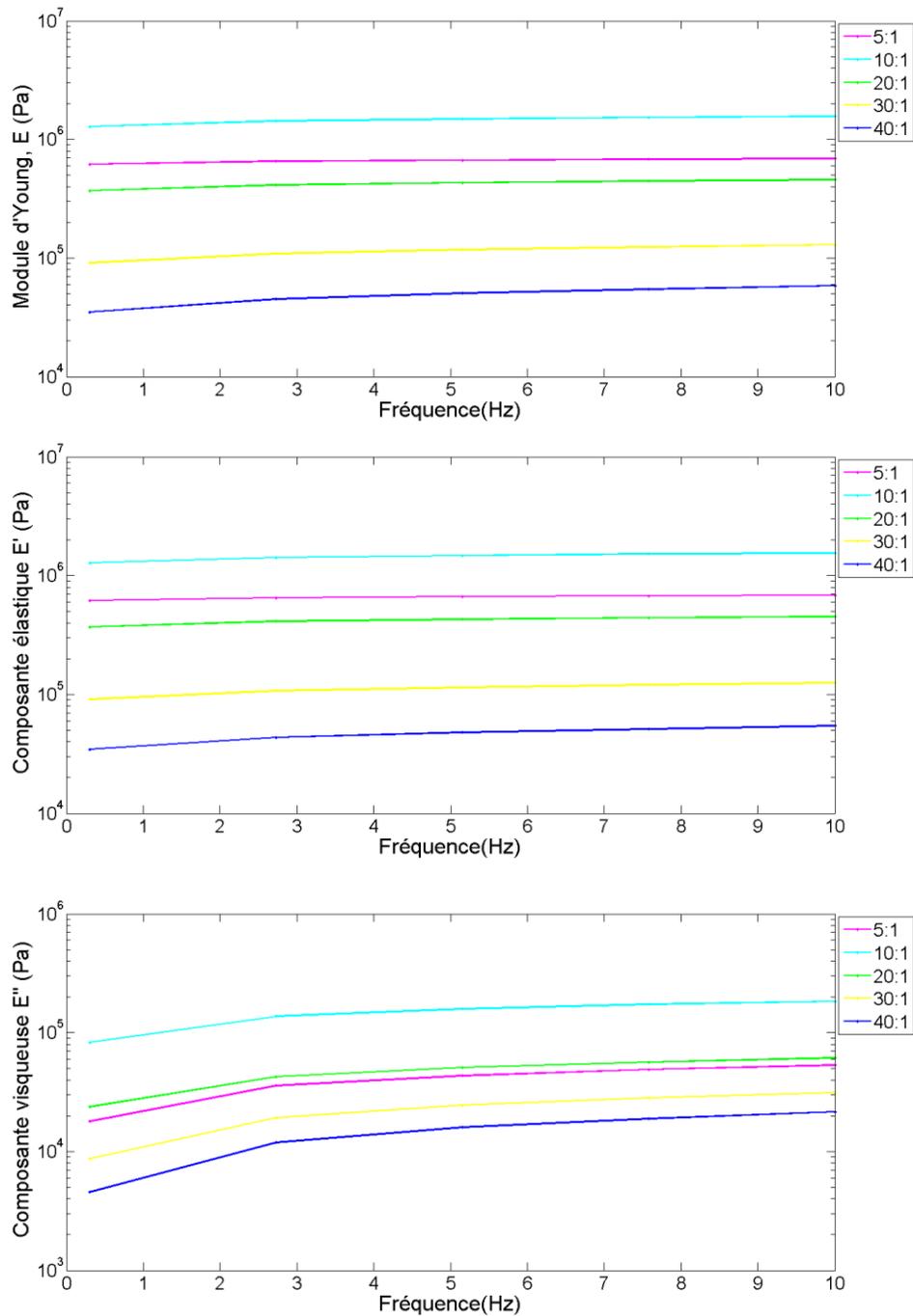


Figure 3.1 Analyse mécanique dynamique.

A) Module d'Young E . B) Composante élastique E' C) Composante visqueuse E'' , en fonction de la fréquence d'oscillation avec une amplitude de $100\mu\text{m}$, pour les différents ratios de PDMS (représentés par les différentes couleurs).

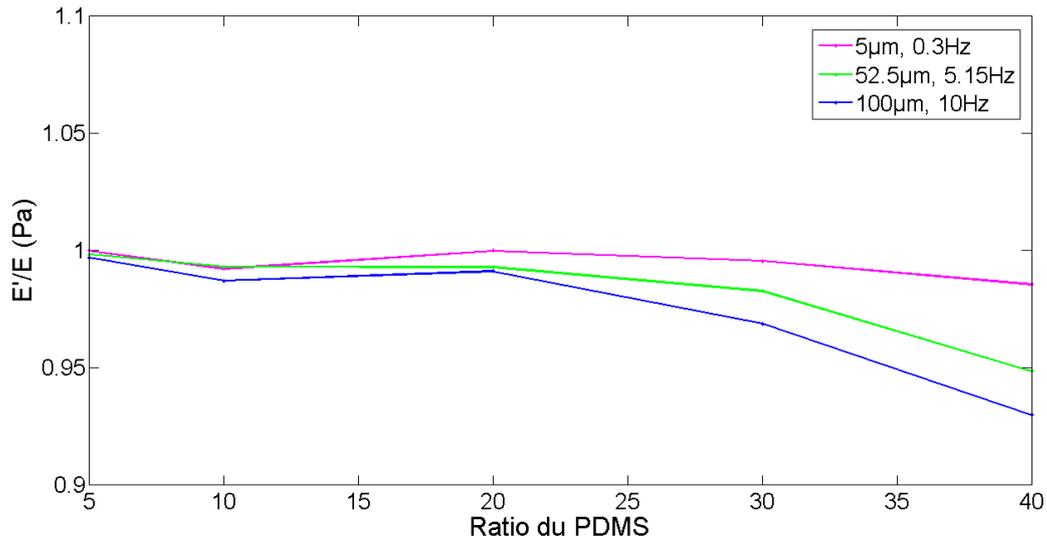


Figure 3.2 Rapport composante élastique /module d'Young en fonction du ratio de PDMS

Chaque courbe représente une mesure effectuée à une fréquence et une amplitude donnée.

Même si cet écart est plus important pour 40 :1 et 30 :1, il reste de très faible valeur (~ 0.07). On peut donc considérer ces ratios aussi comme purement élastique, d'autant plus que l'on sait que la vitesse de déformation induit par *C. albicans* est 300 fois plus faible on peut affirmer aisément que à l'échelle de *C. albicans* le PDMS se comporte comme un matériau purement élastique.

3.1.2. Module d'Young : effet du ratio PDMS:Réticulant

Etant donnée que le protocole de mesure du module d'Young de PDMS correspondants aux membranes utilisée pour les expériences de biologie avait été établi et suivie avant l'étude des composants élastique et visqueux en fonction de fréquence, j'ai dû maintenir ce protocole qui consiste à faire une analyse mécanique dynamique à 10Hz, pour garder l'homogénéités des résultats. La Figure 3.3 montre que plus la concentration en agent réticulant est faible (ratio PDMS/ agent réticulant plus élevé) plus le module d'Young est faible. A noter que cette figure est différente de celle présentée dans l'article (Annexes), elle représente la moyenne de module d'Young (donnée par la machine et non calculé par la théorie d'élasticité) de tous les échantillons de PDMS (avec ou sans résultats concluant sur la croissance de *C. albicans*) et montre les ratio 10:1 et 20:1 non utilisé pour la fabrication de la membrane.

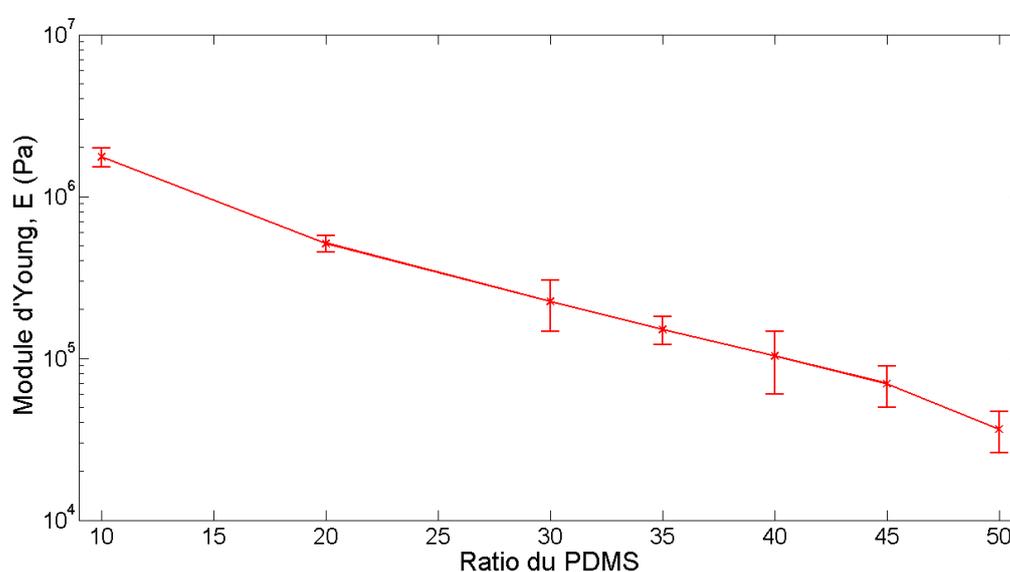


Figure 3.3 Module d'Young du PDMS

Les échantillons 20mm*20mm*5mm de différent ratio de PDMS, réticulés 1h à 60°C puis 2h à 90°C ont été oscillé à 10Hz et le module d'Young a été donné par la machine DMA. Chaque point correspond à une moyenne de 10 à 35 échantillons, les barres d'erreur sont les écart-type.

3.1.3. Module d'Young : Effet du vieillissement et de la diffusion de l'eau

Les membranes de PDMS, n'étaient pas utilisé pour l'expérience de biologie le jour même de la fabrication (ni forcément le jour de la mesure de module d'Young) et étaient maintenues pendant plusieurs jours dans l'eau. Il fallait vérifier si le temps et la présence d'eau affectaient les mesures de module d'Young. Pour cela, dans un échantillon de PDMS deux carrés étaient découpés, leur module d'Young était mesuré le jour de la fabrication, ensuite l'un était plongé dans l'eau pure, et l'autre laissé à sec, au bout de 3 et 5 jours les mesures ont été faites (Figure 3.4 ; Annexes : Figure 0.10).

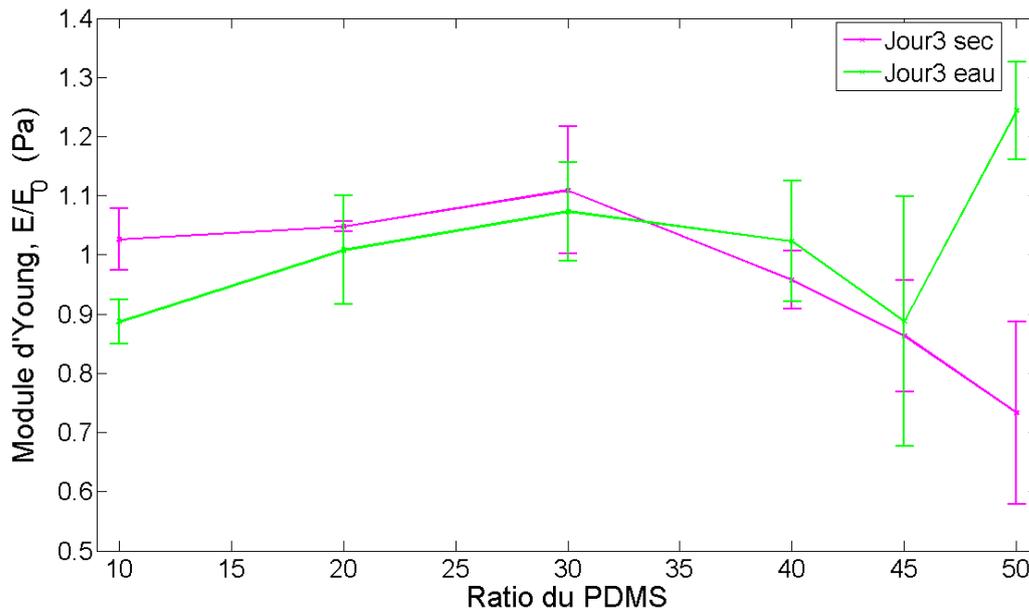


Figure 3.4 L'effet du vieillissement et de la diffusion de l'eau sur le module d'Young de PDMS

En magenta la mesure 3 jours après la fabrication de l'échantillon normalisée par la mesure initiale (le jour de la fabrication de l'échantillon). En vert la mesure 3 jours après la fabrication de l'échantillon et mise dans l'eau pure normalisée par la mesure initiale (le jour de la fabrication de l'échantillon, E_0). Les barres d'erreur sont les écart-types de module d'Young mesuré plusieurs fois sur le même échantillon.

Cette série d'expériences nous a permis de voir que les valeurs de module ne varient pas de manière notable en l'espace de 3 jours. Pour le PDMS sec, on observe une augmentation de l'ordre de quelques pourcents, qui augmente pour les ratios allant de 10 à 30. Alors que pour les ratios plus élevés, au contraire, il semble se produire une diminution plus forte (Figure 3.4). D'après Placet et Delobelle (Placet et Delobelle, 2015), après réticulation le PDMS voit son module augmenter légèrement (Figure 0.11) avec le temps. Les temps caractéristiques pour obtenir une augmentation de 20-25 % sont de l'ordre de plusieurs mois. La raison de ces changements est une réticulation incomplète qui se poursuit avec le temps et rend plus rigide le matériau. Pour les grands ratios, de nombreuses chaînes libres ne trouveront pas de molécules réticulant et l'augmentation peut être plus faible. Il se peut même que la diffusion de chaînes libres, qui ne sont pas réticulées, vers la surface induisent à grand ratio, plutôt une diminution du module. Pour ce qui est de la présence d'eau, les résultats sont identiques un effet inverse se produit : le module diminue légèrement, alors que pour les grands ratios, il paraît relativement plus élevé. L'effet au bout de 3 à 5 jours reste tout de même faible, sauf pour les ratio 50:1 où une augmentation notable se produit. Cela peut s'expliquer par la taille de pore plus grande et une accumulation plus importante d'eau dans le PDMS.

3.2. Indentation

L'invasion de *Candida albicans* dans la membrane en PDMS implique d'abord la mécanique d'indentation entre le filament et le PDMS, suivie d'une rupture, il était donc de très grand intérêt d'étudier la mécanique d'indentation et de l'initiation et de propagation de la fracture. Pour ce un montage de l'indentation a été monté, que je vous présenterai dans cette partie, ainsi que les résultats de la mécanique du contact et sur la fracture.

3.2.1. Mécanique d'indentation

Dans une expérience d'indentation, on déplace une sonde perpendiculairement à l'interface du matériau et celle-ci déforme le matériau. Après le moment du premier contact, la pointe de la sonde, en avançant, le déforme de plus en plus. Nous avons ici mesuré la loi entre la force et le déplacement de la sonde. Nous montrons d'abord les résultats en fonction des conditions aux bords, du ratio du PDMS, de la vitesse de la sonde, puis finalement nous discutons et interprétons ces résultats en comparant avec les approches théoriques existantes, utilisant un modèle non linéaire. Cela nous permet donc d'étudier toute la première phase d'indentation avant d'atteindre une force critique de rupture que nous étudierons dans la partie suivante.

3.2.2. Effet des conditions aux bords

Nous avons réalisé des expériences avec deux conditions aux bords (Figure 2.15) :

- 1) Le cylindre de PDMS est placé dans un tube métallique, ce qui correspond à $r_{\max} = R$
- 2) Le cylindre est placé contre une plaque de métal, c'est la condition $x_{\max} = L$

Dans les deux cas, on mesure la loi entre force et déplacement. Sur les figures on voit les données expérimentales en bleu et l'ajustement en rouge. Nous avons réalisé un ajustement de ces données avec un polynôme d'ordre 2 ($f(x) = p_1 \cdot x^2 + p_2 \cdot x + p_3$). L'ajustement fonctionne très bien pour la condition au bord $r_{\max}=R$ (Figure 3.5). Dans le cas des échantillons pour lesquels la condition est $x_{\max}=L$ (Figure 3.6), l'accord est moins bon lorsque l'on prend tous les points jusqu'à la rupture, car on observe une déviation de la courbe d'ajustement à la fin de la courbe. Nous détaillerons dans la partie suivante.

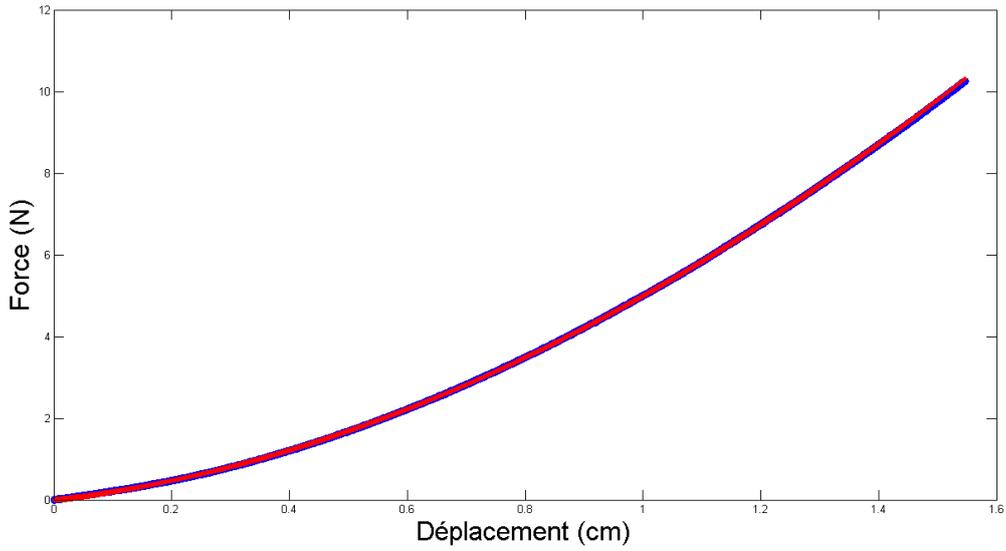


Figure 3.5 Indentation dans le PDMS de ratio 30 :1 $r_{max}=R$

A) L'échantillon de PDMS est un cylindre de rayon 1.5cm et de hauteur 1.75cm avec conditions au bords $r_{max}=R$, l'indentation est effectuée avec une sonde en acier de diamètre 1mm. En bleu les données expérimentales, en rouge l'ajustement avec $f(x) = p1*x^2 + p2*x + p3$.

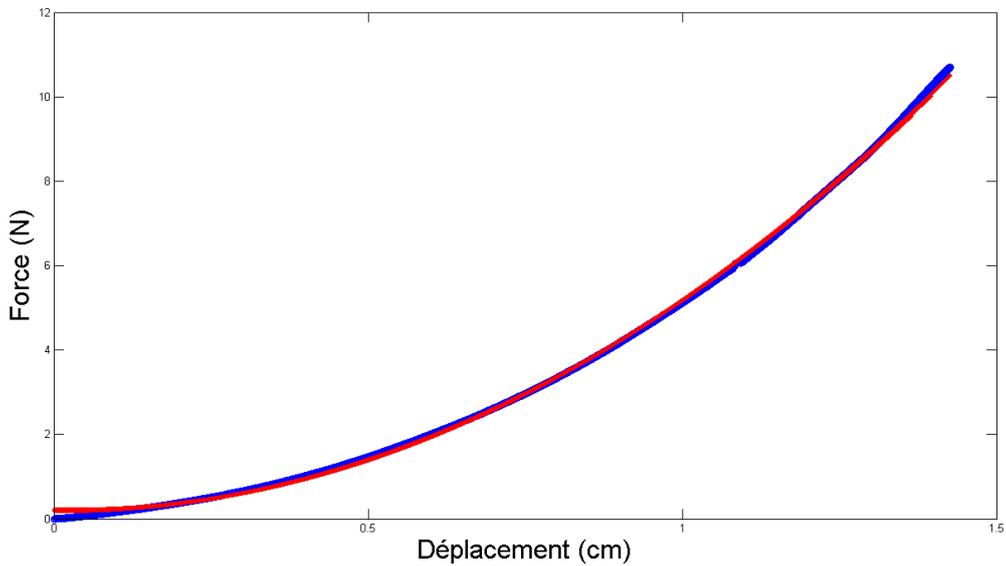


Figure 3.6 Indentation dans le PDMS 30 :1 $x_{max}=L$.

A) L'échantillon de PDMS est un cylindre de rayon 1.5cm et de hauteur 1.75cm avec conditions au bords $x_{max}=L$, indentation est effectuée avec une sonde en acier de diamètre 1mm. En bleu les données expérimentales, en rouge l'ajustement avec $f(x) = p1*x^2 + p2*x + p3$.

3.2.3. Comparaisons avec la théorie

Comme présenté dans l'état de l'art, il existe plusieurs modèles qui décrivent la mécanique de l'indentation, puis qui permettent le calcul de module d'Young. Le modèle JKR (Johnson, Kendall, Roberts (JKR)), prend en compte l'adhésion et permet de décrire des indentations suivies de rétractation (Persson, Sliding Friction, 2000), c'est-à-dire la force en fonction du déplacement quand la pointe de la sonde recule et donc se détache de PDMS. Cette mesure n'était pas possible avec mon montage, car la sonde ne pouvait pas reculer, mais seulement avancer. Sachant que nous nous sommes concentrés sur l'indentation, un modèle adapté paraissait être le modèle de Hertz (Carrillo et al., 2005 ; Rattan et al., 2018). Mais le problème du modèle de Hertz est que l'on ne peut l'utiliser que pour des déplacements $d \ll R$, le rayon de courbure de la pointe, et dans notre cas où R vaut 0.5mm cette zone serait très petite. C'est un modèle où le matériau est supposé suivre la loi de Hooke, donc linéaire, la non-linéarité ne provenant que de la géométrie et non des caractéristiques du matériau. Sachant qu'on envisage des déplacements de plusieurs centimètres, il n'est pas du tout adapté à l'indentation d'un objet allongé sur de « grandes distances ».

J'ai donc décidé d'appliquer un modèle néohookéen (Halary et al., 2008) pour décrire la non-linéarité du matériau et pour décrire l'indentation profonde, je me suis inspiré directement des travaux du groupe de A. Crosby (Fakhouri et al., 2015). Dans leur cas, il s'agit de l'indentation d'une tige dans un gel placé dans un récipient cylindrique, dont les parois latérales et du fond sont fixes. Ils montrent que l'ajustement des données de la force en fonction du déplacement $F(d)$ est donné par la relation :

$$F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' E R d \quad (1.40)$$

L'ajustement polynomial du second degré donne des coefficients $p_1 = k' E$ et $p_2 = k'' E R$. A partir de p_2 on peut donc calculer le module d'Young E , avec $k'' = \frac{8}{3}$ et $R = 0,5 \text{ mm}$ et en déduire k' , qui est une constante géométrique, liée à la déformation radiale.

Pour la condition au bord $r_{\max} = R$, on observe que la courbe polynomiale de l'ajustement suit parfaitement la courbe d'indentation jusqu'à la rupture (Figure 3.5). On en déduit que l'ajustement par cette relation fonctionne très bien et même si la condition au fond ($x_{\max} = L$ ou non) est différente par rapport à Fakhouri et al 2015, la théorie décrit très bien nos expériences.

Pour la condition $x_{\max} = L$, on observe la déviation de la courbe polynomiale de l'ajustement pour des valeurs de déplacement grande $d \gg R$ (Figure 3.6), donc l'accord n'est pas bon pour tous les points jusqu'à la rupture. Cela est normal sachant que les étirements sont différents. J'ai décidé de réaliser ces ajustements sur une zone plus restreintes (Figure 0.12 et Figure 0.13).

Pour déterminer le module d'Young, E , j'ai calculé la moyenne de p_2 issues des ajustements effectués sur la 1) un quart de la courbe (25%) 2) la moitié de la courbe (50%) 3) la courbe jusqu'à la rupture (100%), pour chaque ratio indenté à $3 \mu\text{m/s}$ dans les deux conditions (Figure 3.7).

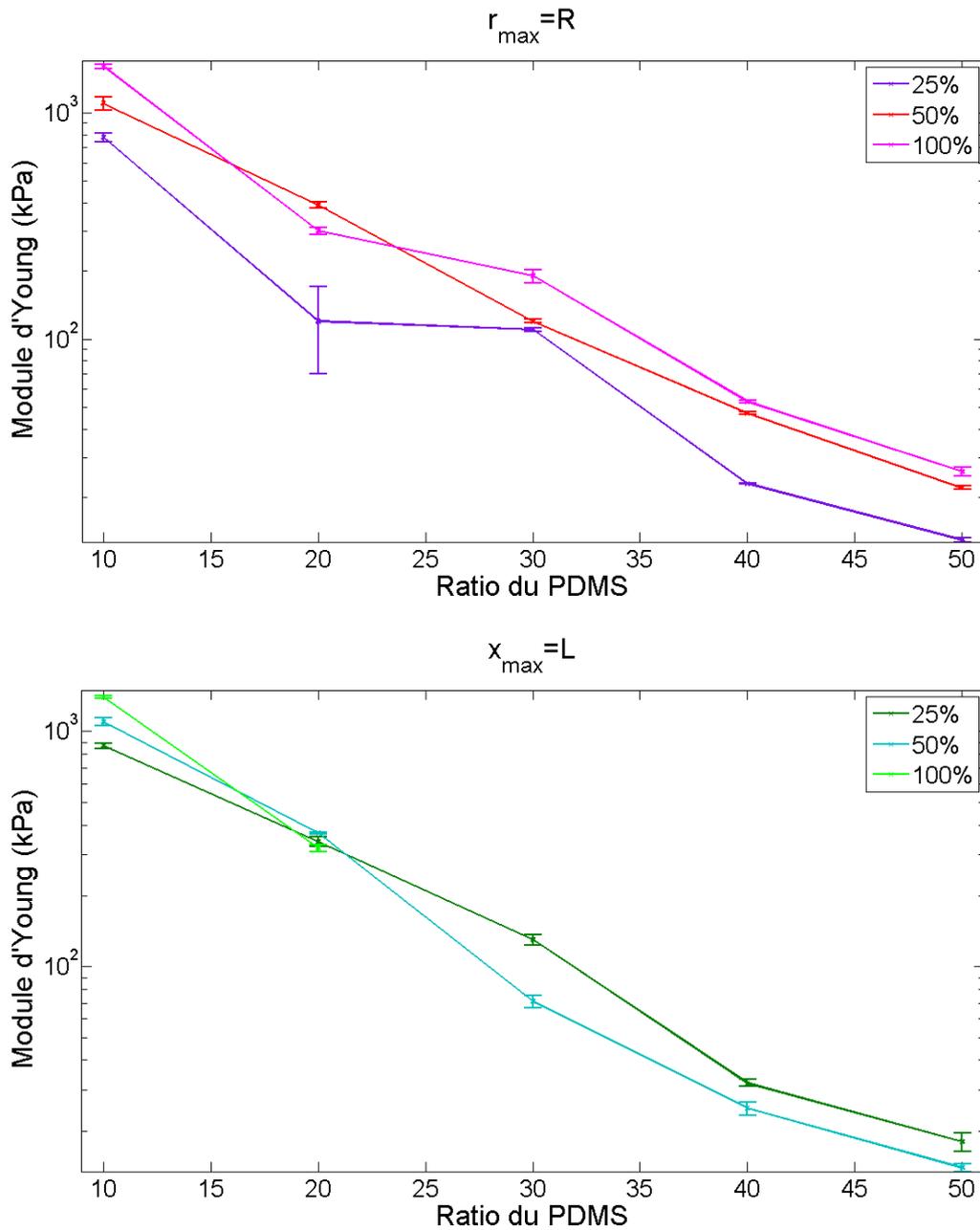


Figure 3.7 Module d'Young de PDMS $r_{\max}=R$ et $x_{\max}=L$.

Les sondes en acier ont indenté des échantillons cylindriques $r_{\max}=R$ et des échantillons cylindriques $x_{\max}=L$ de différents ratios de PDMS, réticulés 1h à 60°C puis 2h à 90°C, et le module d'Young a été donné par le modèle néohookéen de Fakhouri et al. $F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' E R d$ (1.40). Chaque point correspond à une moyenne de 5 valeurs de coefficients issues des ajustement effectués sur 1) le premier quart de la courbe (25%) 2) la moitié de la courbe (50%) 3) la courbe jusqu'à la rupture (100%), pour chaque ratio indenté à 3 $\mu\text{m/s}$, les barres d'erreur sont les écart-types.

L'ajustement sur un quart de la courbe donne des valeurs très faibles du module d'Young pour la condition $r_{\max}=R$, mais aussi dans la condition $x_{\max}=L$, dont les valeurs sont néanmoins supérieures à celles données par $r_{\max}=R$ (Figure 0.14A). L'ajustement de 50% de la courbe donne les mêmes valeurs pour les ratios 10 :1 et 20 :1, mais pour les ratios de 30 :1 à 50 :1 le module d'Young mesuré dans la condition $r_{\max}=R$ sont supérieures à celles de $x_{\max}=L$ (Figure 0.14B). Pour $r=R$ la différence entre les modules d'Young, issues des ajustements sur 50% et 100% de la courbe d'indentation, est très faible pour les PDMS 40 :1, 50 :1 (Figure 3.7).

Il faut noter que l'ajustement sur la totalité de la courbe d'indentation ne fonctionnant pas sur les échantillons $x_{\max}=L$ donne des valeurs négatives de module d'Young pour le PDMS peu rigide (30:1, 40:1, 50:1), alors que pour le PDMS rigide (10:1, 20 :1) les valeurs de module d'Young sont positives et du même ordre que celles mesurées sur $r_{\max}=R$ (Figure 3.7 et Figure 0.14 C). Ceci peut être expliqué par le fait que la hauteur L du cylindre n'est sûrement pas assez longue, et l'évolution de la force ressentie par la sonde est influencée par la plaque métallique. C'est-à-dire que la profondeur de pénétration est du même ordre que la longueur du cylindre.

Pour savoir comment se comporte le PDMS dans une condition aux bords et une autre et déterminer l'effet du ratio PDMS : Réticulant sur le module d'Young mesuré par le modèle néohookéen de Fakhouri et al., j'ai décidé de faire les ajustements sur plusieurs courbes d'indentation jusqu'à la rupture. Avec les ajustements (25% et 50%) le module d'Young serait sous-estimé. Et étant donné qu'avec la condition $x_{\max}=L$ l'ajustement sur la courbe d'indentation jusqu'à la rupture (100%) dévie et donne des valeurs négatives de module d'Young, je ne poursuivrai qu'avec la condition $r_{\max}=R$.

Pour comparer nos résultats avec la théorie et un peu mieux comprendre la nature de la réponse de l'élastomère sous forte indentation, une autre approche est possible pour présenter nos résultats. Il s'agit de supposer connue la valeur des modules d'Young pour les différents ratios et de déduire des ajustements polynomiaux selon l'Eq. 1.41, la valeur du paramètre k' pour le terme quadratique. Je présente à Figure 3.8 les valeurs du coefficient d'ajustement du terme en d^2 (p_1) en fonction des modules mesurés par l'analyse dynamique (E_{DMA} de la Figure 3.3, reprise dans la partie suivante, Tableau 3.1). La pente attendue est égale à k' . Je présente les résultats obtenus en considérant des ajustements sur le premier quart, la première moitié et la totalité des points des courbes $F(d)$. Selon la partie ajustée, on observe des variations liées à fait que la théorie est approchée et ne décrit pas parfaitement les conditions aux bords utilisées, et ne décrivant pas les écarts à l'élasticité lorsqu'on se rapproche du point de rupture. En considérant les ajustements à 50 % pour éviter ce dernier point, on trouve pour les deux conditions aux bords $r_{\max}=R$ et $x_{\max}=L$, respectivement, $k' = 0.27$ et $k' = 0.3$. C'est très proche de la valeur trouvée pour des gels par Fakhouri et al. (2015) qui était de 0.26.

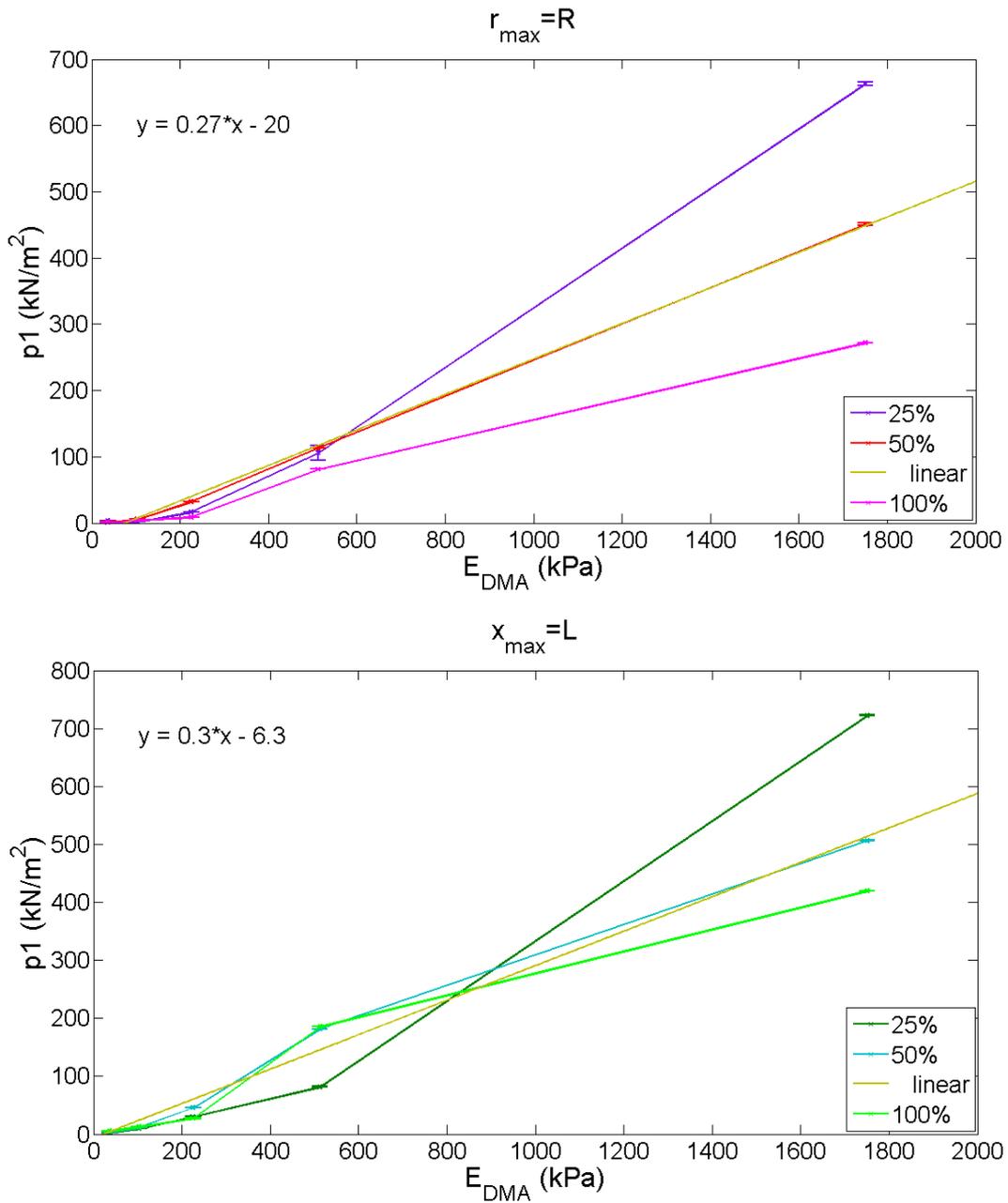


Figure 3.8 k' de PDMS $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$.

Les sondes en acier ont indenté des échantillons cylindriques $r_{max}=R$ et des échantillons cylindriques $x_{max}=L$ de différents ratios de PDMS, réticulés 1h à 60°C puis 2h à 90°C, et le module d'Young a été donné par le modèle néohookéen de Fakhouri et al. $F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' E R d$ (1.40). Chaque point correspond à une moyenne de 5 valeurs de coefficients issues des ajustement effectués sur 1) le premier quart de la courbe (25%) 2) la moitié de la courbe (50%) 3) la courbe jusqu'à la rupture (100%), pour chaque ratio indenté à 3 μ m/s, les barres d'erreur sont les écart-types.

3.2.4. Effet du ratio PDMS : réticulant

La Figure 3.9 montre le module d'Young calculé dans cette expérience d'indentation, suivant l'Eq. 1.41 en fonction du ratio du PDMS.

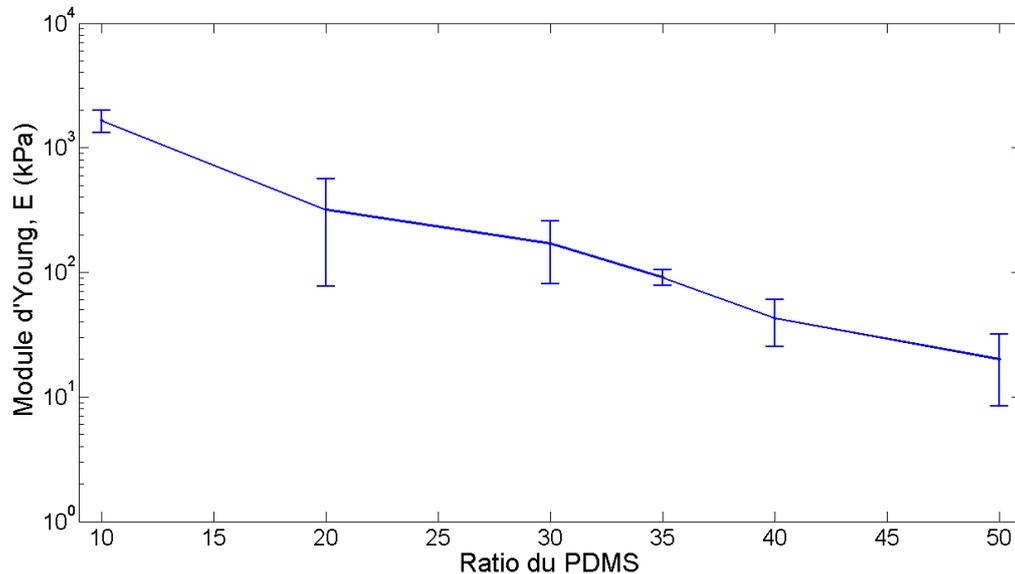


Figure 3.9 Module d'Young du PDMS pour une vitesse de sonde en termes de diamètre par minute équivalente à la vitesse de croissance de *C. albicans*

La courbe en bleu représente les données obtenues par l'indentation de la sonde d'acier à $3,49\mu\text{m/s}$, dans les 2 types d'échantillons cylindriques ($8\text{cm} \times 2\text{cm}$ et $3\text{cm} \times 1,75\text{cm}$) et pour différents ratios de PDMS, $r_{\text{max}}=R$, réticulés 1h à 60°C puis 2h à 90°C . Le module d'Young est donné par le modèle néohookéen de Fakhouri et al. (Fakhouri et al., 2015), en faisant l'ajustement sur la courbe entière jusqu'à la rupture. Chaque point correspond à une moyenne de 5 à 10 mesures de différents cylindres de PDMS, les barres d'erreur sont les écart-types.

Quand on compare les valeurs de module d'Young issues d'une analyse mécanique dynamique et celles déterminées en utilisant le modèle néohookéen de Fakhouri et al. $F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' E R d$ (1.40) de l'indentation, on observe que les deux approches donnent des résultats cohérents, compte tenu des barres d'erreur (Tableau 3.1) (Annexes : Figure 0.15). Néanmoins ce modèle néohookéen donne des valeurs légèrement inférieures, ce qui peut être expliqué par la dépendance des mesures sur la fréquence d'oscillation et sur la vitesse d'indentation. Sachant que pendant l'analyse mécanique dynamique une oscillation de 10Hz a été appliquée sur l'échantillon, avec l'amplitude minimale d'oscillation qui est $5\mu\text{m}$, on obtient une vitesse de $50\mu\text{m/s}$, ce qui est nettement supérieur à la vitesse d'indentation $3,49\mu\text{m/s}$.

	10 :1	20 :1	30 :1	35 :1	40 :1	50 :1
E_{DMA}	1.75±0.23 MPa	512±59 kPa	218±77 kPa	156±30 kPa	104±47 kPa	36±10 kPa
$E_{néohookéen}$	1.66±0.33 Mpa	319±242 kPa	170±89 kPa	91±13 kPa	43±5 kPa	20±12 kPa

Tableau 3.1 Comparaison des module d'Young issu d'une analyse mécanique dynamique et du modèle néohookéen de Fakhouri et al. $F = -\sigma_z R^2 = k'Ed^2 + k''ERd$ (1.40) lors d'indentation avec la condition $r_{max}=R$

Les valeurs de module d'Young donné par la machine DMA à l'oscillation à 10Hz correspondent à une moyenne de 10 à 35 échantillons, l'erreur est l'écart-types. Celles données par le modèle néohookéen $F = -\sigma_z R^2 = k'Ed^2 + k''ERd$ (1.40) de l'indentation à 3,49µm/s, correspondent à une moyenne de 5 à 10 mesures de différentes préparations de PDMS, l'erreur est l'écart-types.

Il faut remarquer que, de la littérature on sait que la valeur mesurée par l'indentation dépend de la forme de la pointe d'indentation (Zheng et al., 2017 ; Kundan et Ghatak, 2018). Durant ma thèse, j'ai utilisé plusieurs sondes (Annexes : Figure 0.16) qui n'avaient pas exactement la même courbure. La Figure 3.10 montre le module d'Young mesuré sur le PDMS 40:1 (~43±5 kPa). Les quatre premières colonnes correspondent aux mesures effectuées par les différentes sondes (n°1, 2, 3, et 4), pour chaque sonde sur la même fabrication de PDMS. Les deux dernières colonnes correspondent aux mesures effectuées par la même sonde (n°4), mais sur deux différentes fabrications de PDMS. L'écart-type de module d'Young est de 7kPa pour une indentation sur les PDMS de la même fabrication, avec la même pointe et à la même vitesse. En gardant la même pointe et la même vitesse et en faisant les indentations sur différents échantillons de PDMS, l'écart-type est de même ordre (7kPa, 11%), il faut noter qu'on a le même ordre de grandeur d'écart-type quand on fait la moyenne (~43±5 kPa pour le PDMS 40 :1) des mesures à la même vitesse, avec des pointes de courbures différentes, sur des PDMS de différentes fabrications. Donc la variation issue de différentes fabrications de PDMS est plus importante que celle induit par la courbure de la pointe, à ce titre je néglige dans cette partie la courbure de la pointe.

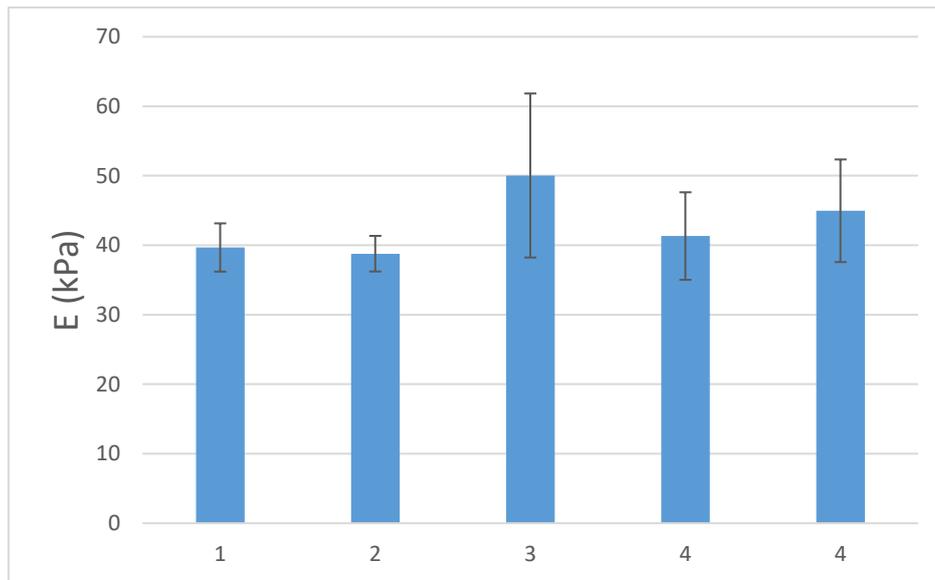


Figure 3.10 Module d'Young de PDMS 40:1 $r_{max}=R$ mesuré avec différentes sondes

Les quatre sondes en acier (n°1, 2, 3 et 4) ont indenté des échantillons cylindriques R (8cm*2cm et 3cm*1,75cm) de PDMS 40:1, issues de préparations individuelle (la sonde 4 figure deux fois, ces deux histogrammes correspondes aux mesures effectués sur deux différents préparations de PDMS), et le module d'Young a été donné par le modèle néohookéen de Fakhouri et al. $F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' ERd$ (1.40). Chaque point correspond à une moyenne de 3 à 8 échantillons pour chaque ratio indenté à des vitesses différentes $3\mu\text{m/s}$ à $30\mu\text{m/s}$, les barres d'erreur sont les écart-types.

3.2.5. Effet de la vitesse d'indentation

De la même manière que le module d'Young calculé par une analyse mécanique dynamique dépend de la fréquence, on peut s'attendre que le module d'Young calculé par l'indentation dépende de la vitesse d'indentation, sur l'exemple du ratio de PDMS 40 :1 la Figure 3.11 montre que c'est effectivement le cas.

La Figure 3.9 illustre le module d'Young déterminé par le modèle néohookéen de Fakhouri et al. $F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' ERd$ (1.40), à partir des expériences d'indentation à $3,49\mu\text{m/s}$. Cette valeur de la vitesse correspond à une vitesse de 20% du diamètre de la sonde par minutes, ce qui, relativement à la taille de l'hyphe est aussi la vitesse moyenne de croissance dans le PDMS.

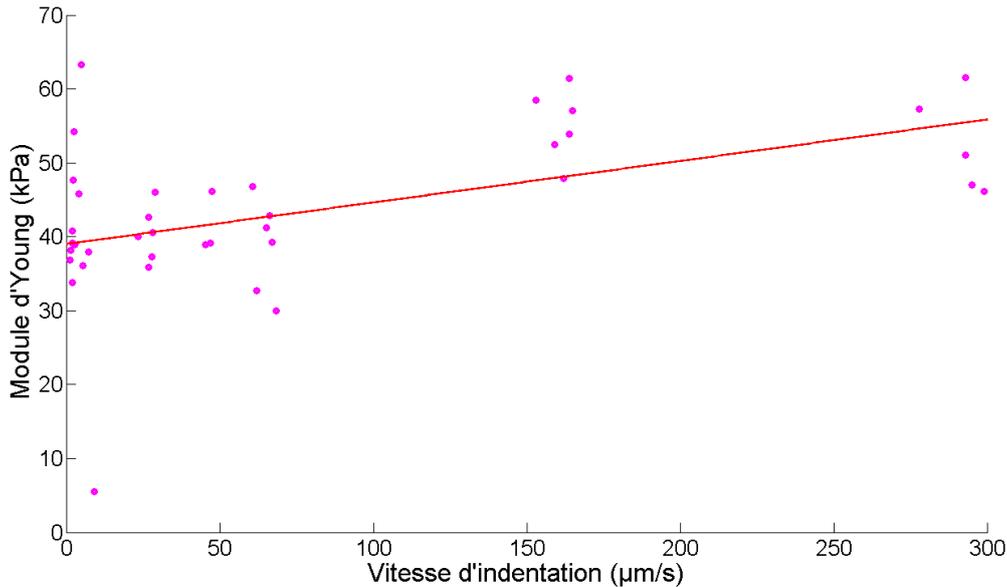


Figure 3.11 Module d'Young du PDMS déduit des expériences d'indentation en fonction de la vitesse d'indentation

Les sondes en acier ont indenté à des vitesses différentes $3\mu\text{m/s}$ à $300\mu\text{m/s}$ des échantillons cylindrique ($8\text{cm} \times 2\text{cm}$ et $3\text{cm} \times 1,75\text{cm}$) de PDMS 40 :1, réticulés 1h à 60°C puis 2h à 90°C , et le module d'Young a été donné par le modèle néohookéen de Fakhouri et al. $F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' E R d$ (1.40). En magenta les données expérimentales, en rouge un ajustement linéaire pour visualiser la tendance.

3.3. Perforation

Dans la partie précédente, nous avons étudié le comportement des échantillons de PDMS lorsqu'ils sont indentés par une tige métallique millimétrique jusqu'à un déplacement de l'ordre de 1cm. Le PDMS se déforme sur de grandes amplitudes sans pour autant se fracturer. Pour des déplacements encore plus grands, on observe la rupture du matériau et la pénétration de la tige métallique qui perce le PDMS de manière irréversible. Dans cette partie, nous allons étudier cette deuxième phase et voir les effets des différents paramètres comme le ratio du PDMS, les conditions aux bords, la vitesse de la tige et la géométrie de la sonde et de l'échantillon de PDMS.

3.3.1. Exemples de perforations

La Figure 3.12 montre un exemple d'indentation observée avec perforation. Sur ce montage on voit une sonde en acier avec une pointe hémisphérique avancer dans le PDMS 40 :1, plus la sonde avance plus le ménisque est déformé (images 1,2,3 de la première ligne et 1 et 2 de la deuxième ligne) jusqu'à ce que la fracture soit initié, donc que la sonde ait pénétré dans le PDMS. Puis elle continue à avancer dans le matériau (ligne 2 colonne 3, ligne 3 colonne 1) et finit par ressortir de l'autre face du PDMS.

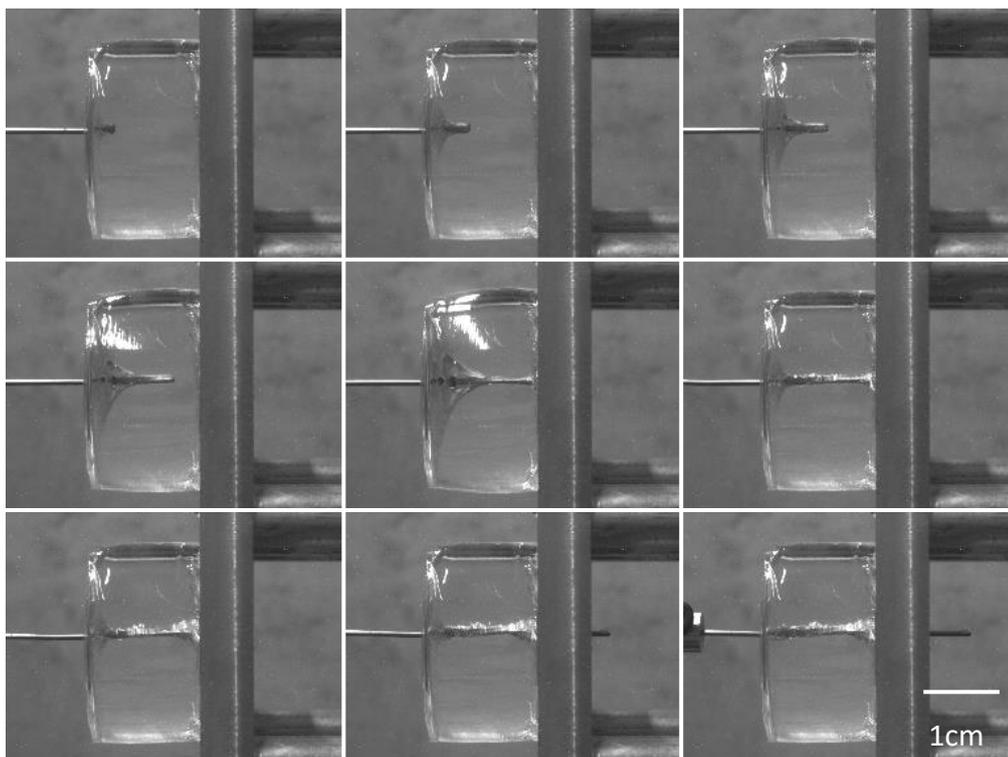


Figure 3.12 Perforation dans le PDMS 40:1

Indentation de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $3 \mu\text{m/s}$ dans du PDMS 40:1 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur au conditions de bord $x_{\text{max}}=L$. L'échantillon de PDMS a été réticulé 1h à 60°C puis 2h à 90°C . Les images ont été prise par une caméra Pixelink.

Le profil de la force durant cette indentation est représenté par la Figure 3.13. Après que la sonde a parcouru 1,65cm dans le PDMS, la force critique requise pour la rupture (4,8 N) est atteinte et le PDMS est fracturé. Sur cette courbe on observe que la force, mesurée lors du déplacement de la tige dans le PDMS, n'est pas constant, on a une seconde rupture peu après la première. Ce genre de phénomène est assez récurrent et complique l'interprétation de la force, augmente donc l'incertitude sur cette valeur. Durant les indentations on observe également assez souvent un phénomène appelé « stick-slip » (coller-glisser), ce qui se manifeste en oscillations de la force (Figure 3.14), qui est due à l'adhésion suivi d'un glissement brusque et irrégulier du PDMS sur la surface de la sonde, que l'on ne distingue pas à l'œil.

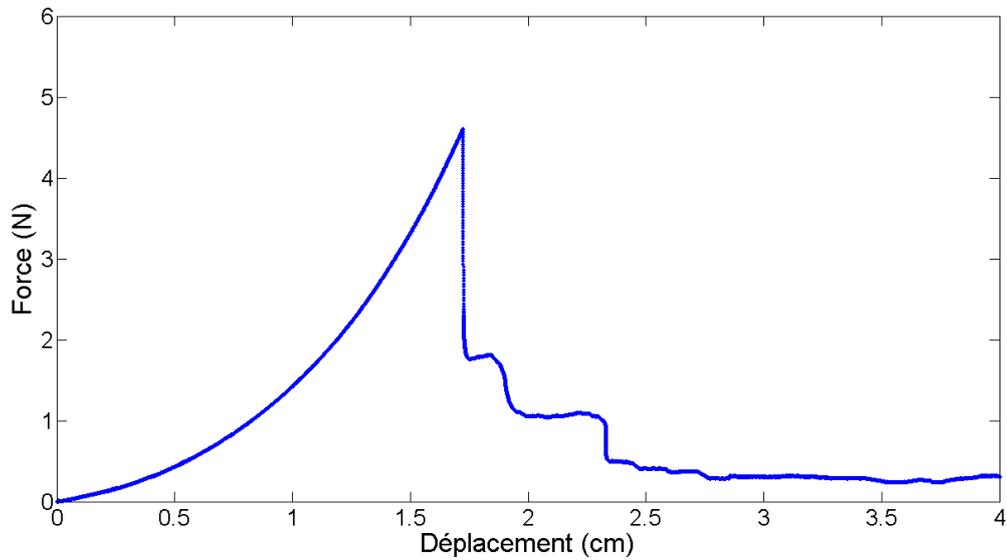


Figure 3.13 Profil de la force en fonction du déplacement de l'indentation de PDMS 40:1

Indentation de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse 3 μm/s dans le PDMS 40:1 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur au conditions de bord $x_{max}=L$. L'échantillon de PDMS a été réticulé 1h à 60°C puis 2h à 90°C.

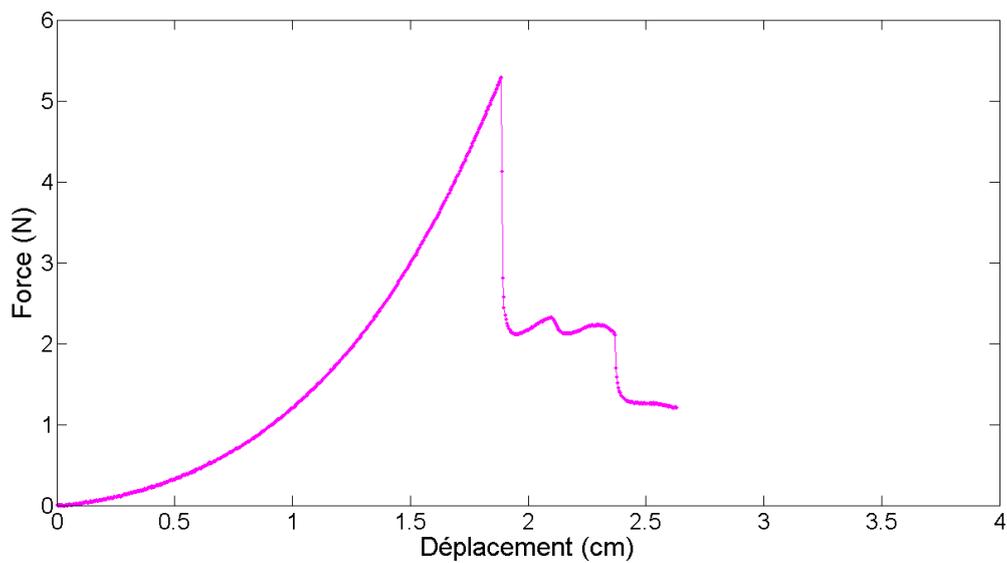


Figure 3.14 Phénomène « Stick-slip » sur le profil de la force d'indentation

Indentation de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse 60 μm/s dans le PDMS 40:1 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur au conditions de bord $x_{max}=L$. L'échantillon de PDMS a été réticulé 1h à 60°C puis 2h à 90°C.

Pendant l'indentation à l'œil on peut observer un phénomène se rapprochant de la cavitation dans des solides mous (Kang et al., 2017 ; Barney et al., 2020) (Figure 3.15), sur l'image de la deuxième ligne, troisième colonne, une bulle d'air est créée, puis l'air est chassé, mais on observe encore les lignes (surfaces) de fracture qui sont sur une zone plus importante que d'habitude (images 3 de la deuxième ligne et 1 de la troisième ligne), c'est-à-dire assez loin de la tige indentant. Ce phénomène est très rare et je n'avais pas assez de données pour l'examiner davantage, mais il serait intéressant à explorer. La cavitation dans des liquides apparait lors de dépression, dans des matériaux polymères ou mou, il s'agit a priori de tension.

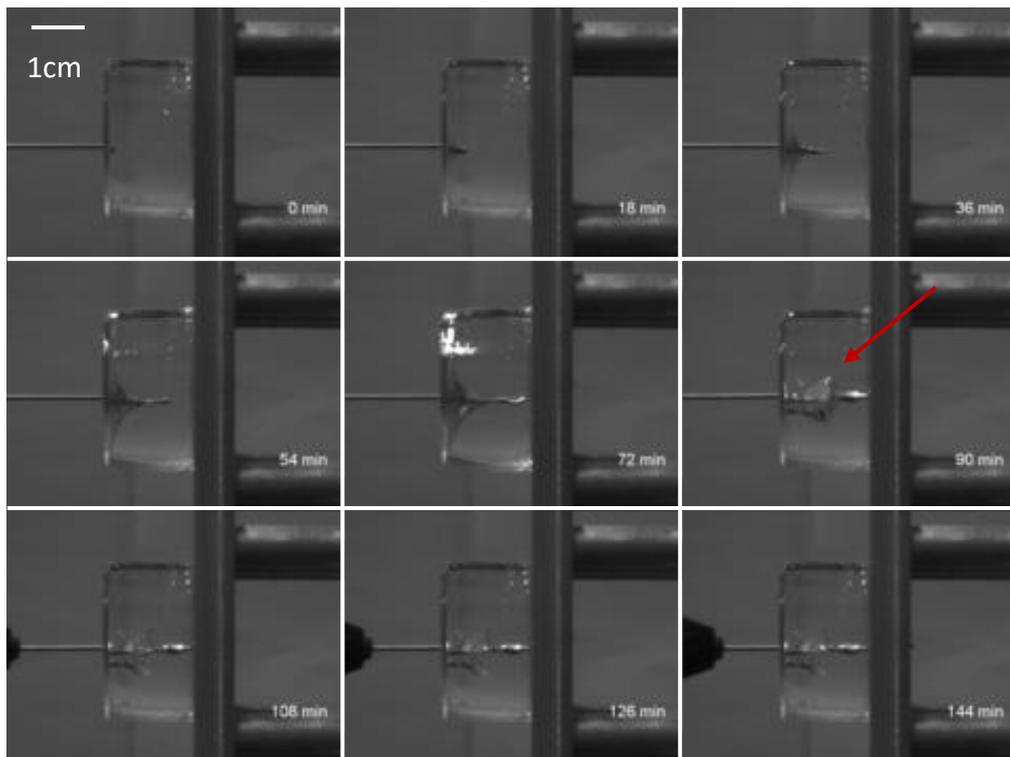


Figure 3.15 Observation du phénomène de la rupture complexe dans la zone loin de la tige

Indentation de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $3 \mu\text{m/s}$ dans le PDMS 35:1 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur au conditions de bord $x_{\text{max}}=L$. L'échantillon de PDMS a été réticulé 1h à 60°C puis 2h à 90°C .

Le profil de la force d'indentation en fonction de la distance parcouru par la sonde, correspondant à ce phénomène est représenté sur la Figure 3.16. Sur cette courbe on observe que la pénétration dans le matériau se fait en deux temps, au moment de la rupture la force chute, mais après elle ré-augmente significativement et on observe un troisième pic, qui correspond à la sortie de la sonde de l'autre face de PDMS. Je pense que ce phénomène est intéressant à étudier en observant aussi son effet sur la courbe force – déplacement.

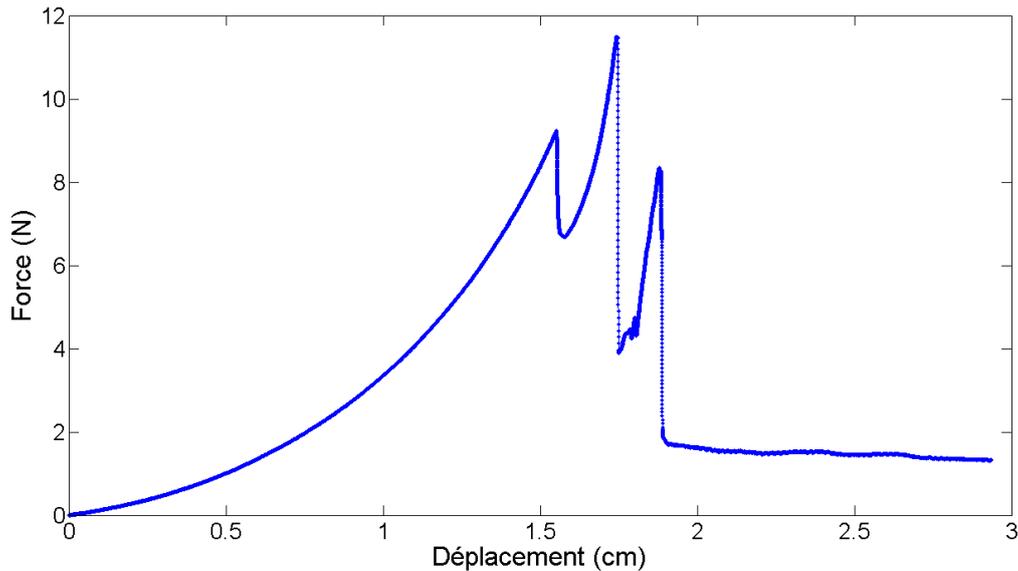


Figure 3.16 Profil de la force en fonction du déplacement lors de rupture se propageant hors de la zone de la tige

Indentation de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $3 \mu\text{m/s}$ dans le PDMS 35:1 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur au conditions de bord $x_{\text{max}}=L$. L'échantillon de PDMS a été réticulé 1h à 60°C puis 2h à 90°C .

3.3.2. Décomposition de la force en forces clés

Quand la sonde avance dans le PDMS, dans un premier temps, elle comprime le matériau, jusqu'à ce que la force critique nécessaire pour la rupture soit atteinte. Au moment de l'initiation de la fracture on observe une chute drastique de la force, mais celle-là ne s'annule pas. La sonde continue à avancer dans le PDMS, la force appliquée sur elle est la somme des forces de frottements, et de la force lié au phénomène de rupture. Jusqu'à ce que la sonde ressorte de l'autre face du PDMS. Dans ce cas de figure la fracture est déjà produite sur toute la longueur du PDMS et la force enregistrée par la sonde n'est que celle de frottements (Figure 3.17 et Figure 3.18).

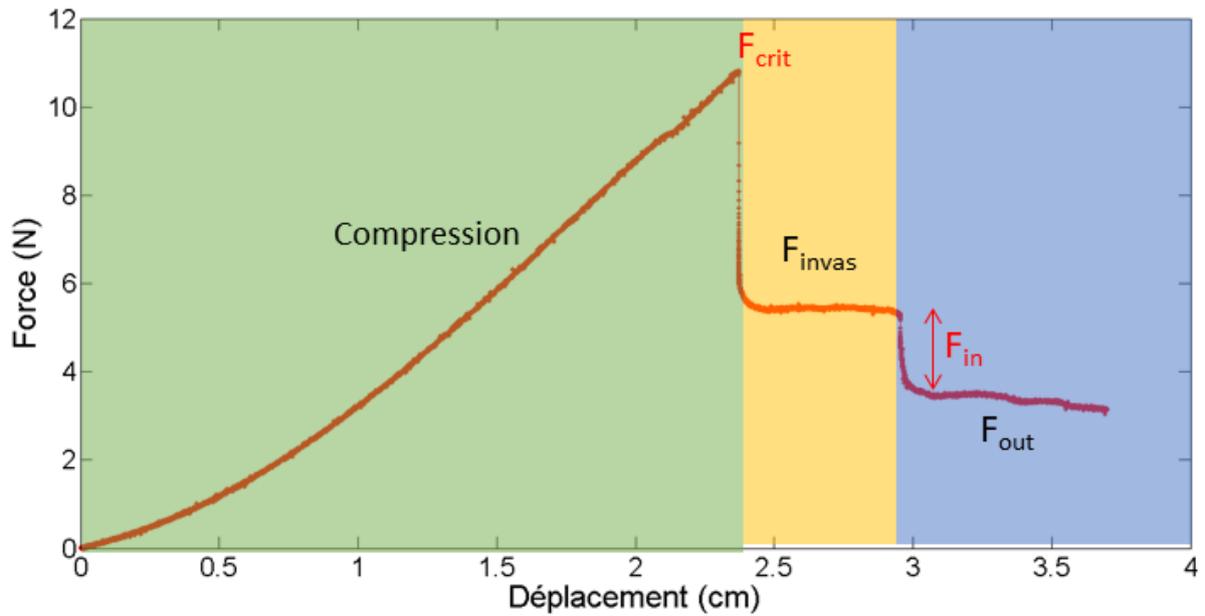


Figure 3.17 Profil typique de la force en fonction du déplacement et définition des termes caractérisant les forces caractéristiques de chaque étape

Perforation avec une sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $2,7\mu\text{m/s}$ dans le PDMS 30:1 8cm de diamètre, 2cm de longueur au conditions de bord $r_{\text{max}}=R$.

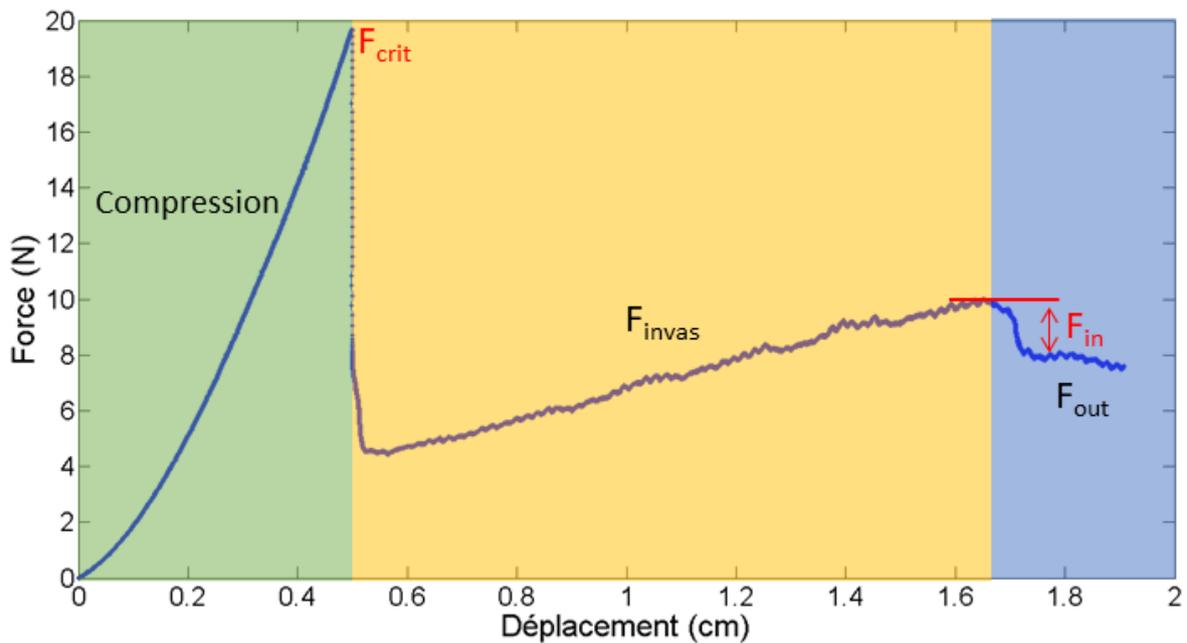


Figure 3.18 Profil typique de la force en fonction du déplacement et définition des termes caractérisant les forces caractéristiques de chaque étape

Perforation avec une sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $2,7\mu\text{m/s}$ dans le PDMS 10:1 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur au conditions de bord $x_{\text{max}}=L$.

D'après les courbes de force en fonction du déplacement, on définit :

- La valeur maximale avant rupture : F_{crit} (ou F_c)
- La moyenne du premier plateau après pénétration ou la valeur maximale avant la sortie (dans le cas où la force n'est pas constante et augmente) : F_{invas}
- La moyenne du deuxième plateau (après sortie du PDMS) : F_{out} .
- On peut aussi définir dans certains cas la « pente » de F_{invas} lorsque celle-ci n'est pas constante, mais augmente linéairement.
- La force d'ouverture de fissure : $F_{in} = \max(F_{invas}) - F_{out}$
- La valeur de déplacement quand la force est maximale avant rupture : d_{crit}

3.3.3. Effet du ratio PDMS : Réticulant

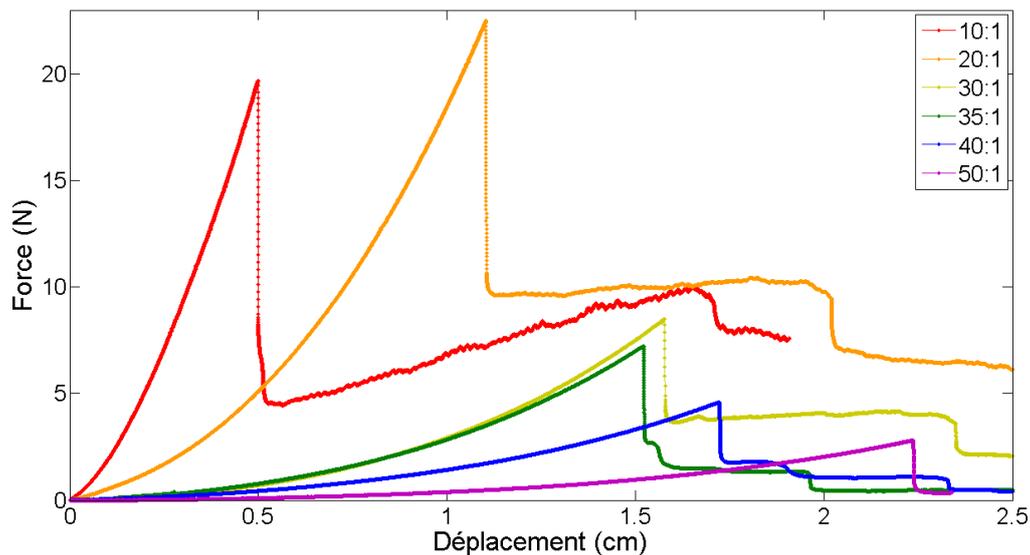


Figure 3.19 Profils de la force pour différents ratios PDMS:Réticulant

Indentation/perforation des cylindres de PDMS 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur aux conditions de bord $x_{max}=L$, avec la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $3 \mu\text{m/s}$. Les échantillons de PDMS ont été réticulés 1h à 60°C puis 2h à 90°C .

Quand on trace sur la même figure, les profils de forces pour différents ratios de PDMS, on observe que plus le PDMS est rigide, plus la force nécessaire pour initier la rupture est grande, et plus la distance critique, à laquelle la rupture est initiée, est petite (Figure 3.19, Figure 3.20 et Figure 3.21). A l'exception du ratio 20 :1 qui présente une force critique plus élevée que le 10 :1, alors que le module d'Young du PDMS 10:1 est plus grand que celui du 20:1.

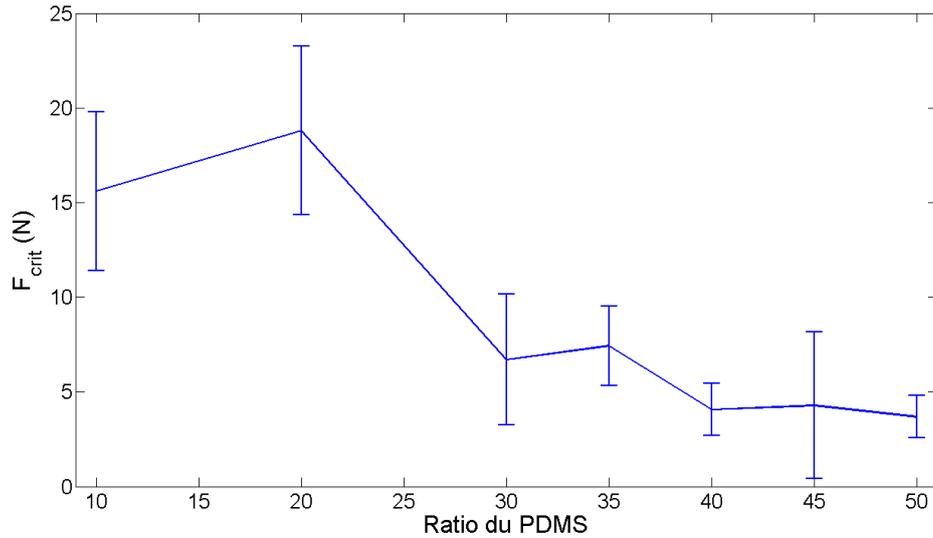


Figure 3.20 F_{crit} en fonction du ratio PDMS:Réticulant

Perforation des cylindres de PDMS 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur, fixé par la surface inférieure du cylindre (échantillon $x_{max}=L$), avec la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3\mu\text{m/s}$ et $30\mu\text{m/s}$. Les valeurs de F_{crit} sont la moyenne de 3 à 15 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

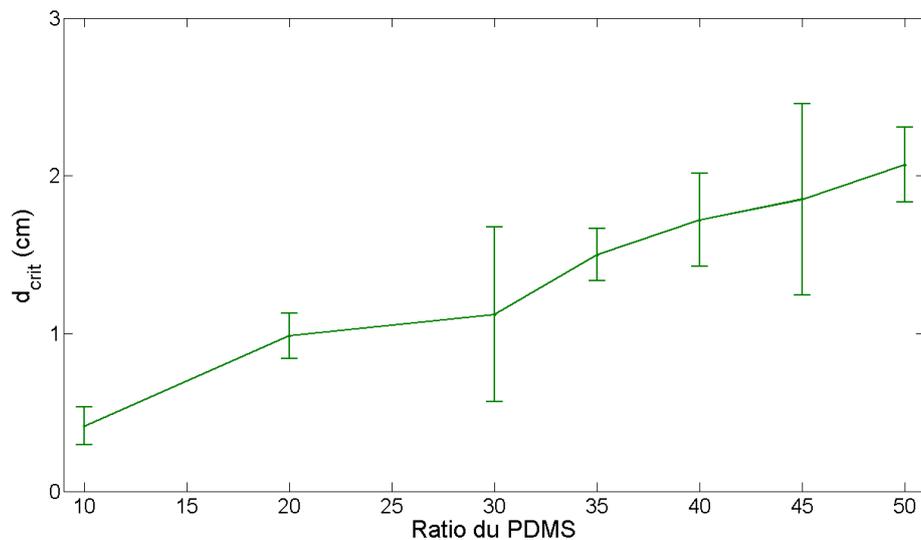


Figure 3.21 d_{crit} en fonction du ratio PDMS:Réticulant

Perforation des cylindres de PDMS 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur, fixé par la surface inférieure du cylindre (échantillon $x_{max}=L$), avec la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3\mu\text{m/s}$ et $30\mu\text{m/s}$. Les valeurs de d_{crit} sont la moyenne de 3 à 15 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

Par ailleurs, Il faut noter que F_{out} et F_{in} sont de plus en plus élevées avec la rigidité croissante. Alors que les valeurs F_{crit} , F_{invas} et F_{in} du PDMS 20:1 sont supérieures à celles de PDMS 10:1, la valeur F_{out} ne l'est pas (Figure 3.22).

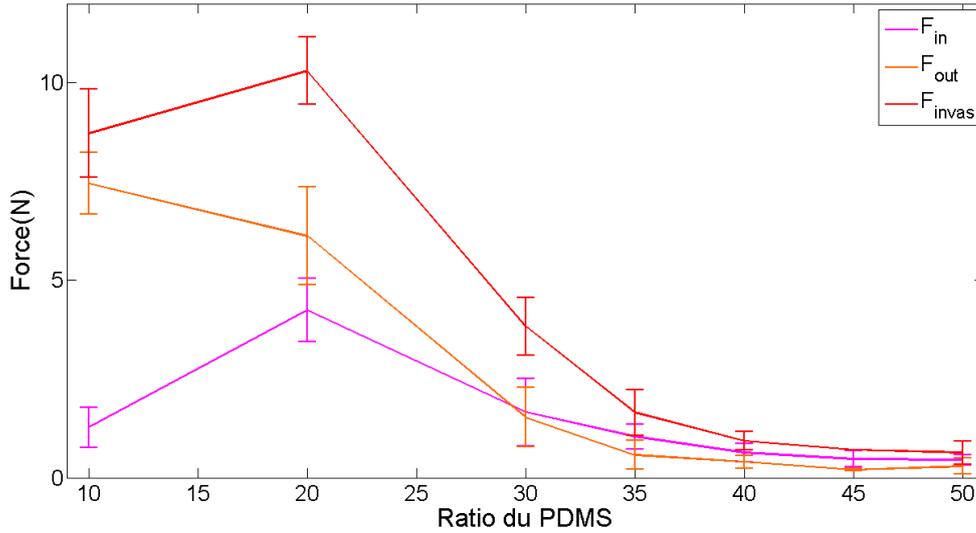


Figure 3.22 F_{in} , F_{out} et F_{invas} en fonction du ratio PDMS:Réticulant

Perforation des cylindres de PDMS 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur, fixé par la surface inférieure du cylindre (échantillon $x_{max}=L$), avec la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $30 \mu\text{m/s}$. Les valeurs de F_{in} (magenta), F_{out} (orange) et F_{invas} (rouge) sont la moyenne de 3 à 15 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

On remarque également que la pente de F_{invas} est plus importante pour les PDMS rigide (Figure 3.23). La pente de F_{invas} peut être expliquée par le fait que, plus la sonde avance dans la matière plus la surface de contact avec le PDMS augmente, donc on a plus de frottements, et comme la force de frottements, F_{out} , est plus importante dans les PDMS rigide, alors la pente est aussi plus importante. Nous verrons cela plus en détail dans la partie discussion.

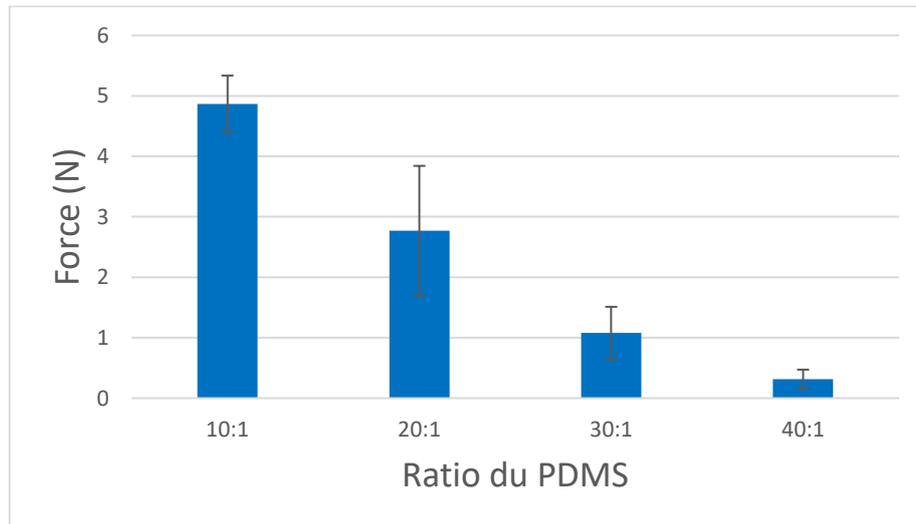


Figure 3.23 Pente de F_{invas}

Perforation des cylindres de PDMS 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur aux conditions de bord $x_{max}=L$, avec la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $3 \mu\text{m/s}$. Les échantillons de PDMS ont été réticulés 1h à 60°C puis 2h à 90°C .

3.3.4. Effet des conditions aux bords

Pour se rapprocher au mieux de la configuration de l'invasion de PDMS par *Candida albicans*, j'ai mis en place l'indentation avec deux conditions aux bords, $x_{\max}=L$ et $r_{\max}=R$, comme décrit sur la Figure 2.16. *C. albicans*, quand elle est initialement dans le puits de PDMS, va indenter une surface courbée (géométrie du puit), mais en considérant le rayon de l'hyphe très petit par rapport à la courbure du puit, on peut considérer que localement il pénètre dans une surface plane. Après l'invasion l'hyphe parcourt un espace de PDMS qui a une surface libre pour la sortie (le puit avoisinant). Pour mimer la sortie de l'hyphe dans l'autre puit il était nécessaire que la surface de la sortie de la sonde soit libre, d'où la condition $r_{\max}=R$ ou l'échantillon est maintenu par un anneau. Mais dans cette condition la sonde entraîne une déformation assez importante de l'échantillon de PDMS qui se bombe, à l'opposé de la tige dès le début d'indentation (Figure 2.16, Annexes : Figure 0.17), ce qui n'est pas exactement le cas pendant l'invasion de *C. albicans* (on observe tout de même, on le verra dans le chapitre 4, une déformation caractéristique à la sortie du PDMS), ni dans la condition $x_{\max}=L$ où l'échantillon est maintenu avec sa surface de sortie adhéree à une plaque métallique. On suppose que la croissance invasive de *C. albicans* est entre les deux conditions aux bords, de ce fait il est important de les comparer.

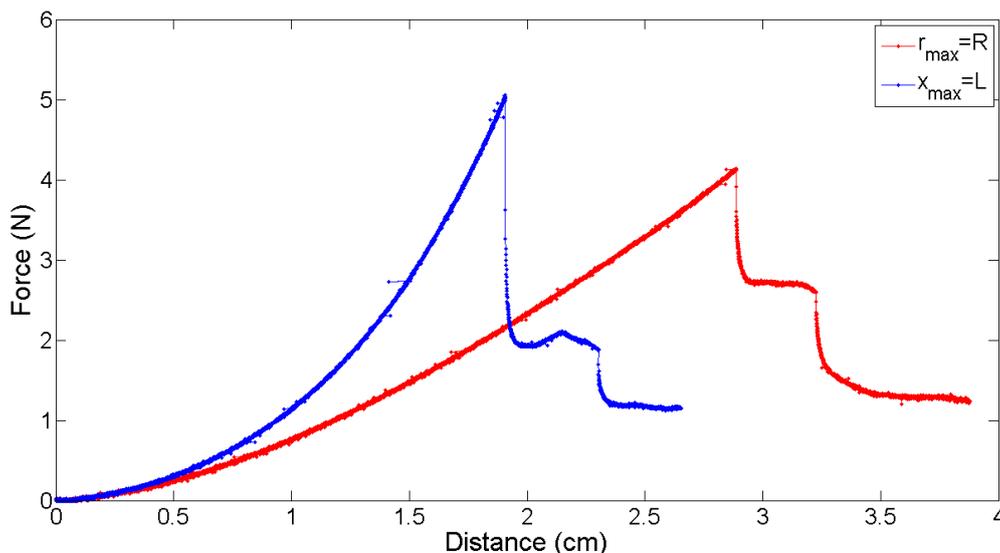


Figure 3.24 Profil de la force de la force d'indentation en fonction de la configuration des conditions aux bords

Perforation des cylindres de PDMS $r_{\max}=R$ et $x_{\max}=L$ du PDMS 40:1, avec la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $2,7\mu\text{m/s}$ dans les cylindres.

Sur la Figure 3.24 on remarque une dépendance de F_{crit} , F_{in} et d_{crit} sur les conditions aux bords, mais ceci n'est qu'un seul exemple. Pour mieux les comparer, les moyennes de F_{crit} , F_{in} et d_{crit} mesurées sur des différentes tailles sont calculées pour chaque condition aux bords. La Figure 3.25 montre que pour le PDMS 40:1 F_{crit} ne varie pas en fonction de conditions aux bords, en revanche F_{in} et d_{crit} sont nettement diminués pour $x_{\max}=L$, il en est de même pour le ratio 30:1 (Figure 0.18). Etant donné que le cylindre de PDMS en $r_{\max}=R$ n'est pas maintenu

par ses faces et que la sonde le déplace (dans le sens du déplacement), on peut facilement expliquer que d_{crit} dans la condition $r_{max}=R$ soit plus élevé.

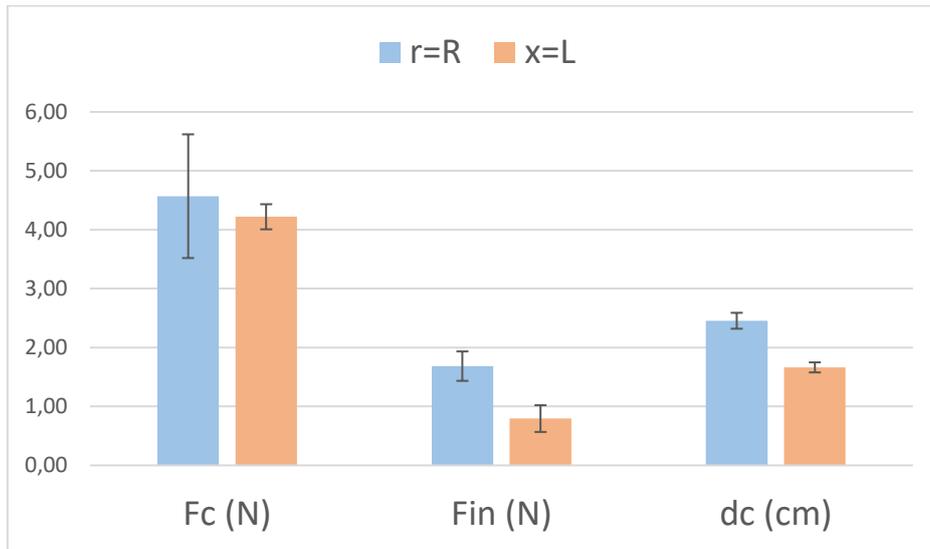


Figure 3.25 F_{in} et d_{crit} pour des conditions aux bords $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, de PDMS 40:1

Perforation des cylindres de PDMS 40:1 avec les conditions aux bords $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $30\mu\text{m/s}$. Chaque histogramme de d_{crit} , F_{crit} et F_{in} déterminé par huit différentes sondes, sur les cylindres ($3,5\text{cm} \times 1.75\text{cm}$ et $8\text{cm} \times 2\text{cm}$), représente la valeur moyenne de 20 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

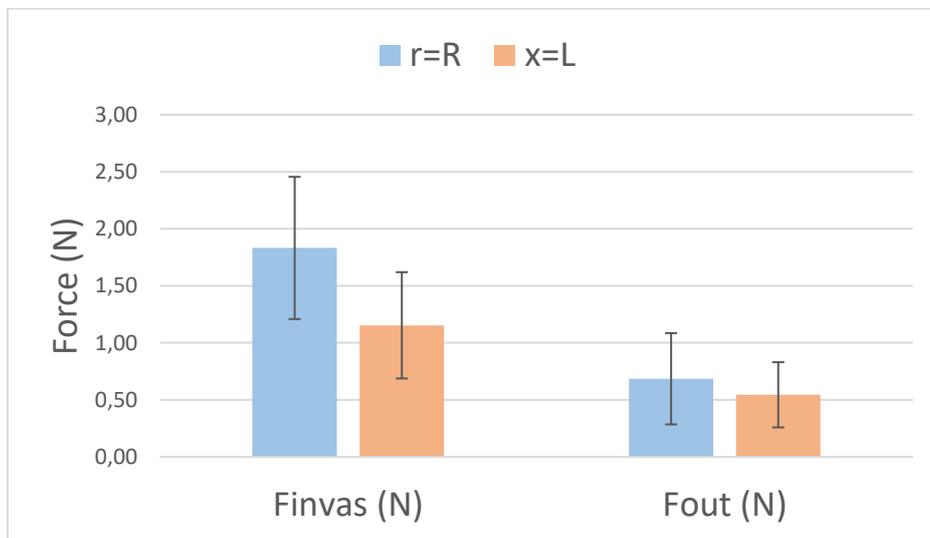


Figure 3.26 F_{invas} et F_{out} pour des conditions aux bords $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, de PDMS 40:1

Perforation des cylindres de PDMS 40:1 avec les conditions aux bords $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $30\mu\text{m/s}$. Chaque histogramme de F_{invas} et F_{out} déterminé par huit différentes sondes, sur les cylindres ($3,5\text{cm} \times 1.75\text{cm}$ et $8\text{cm} \times 2\text{cm}$), représente la valeur moyenne de 20 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

Pour comprendre pourquoi F_{in} dépend de la condition aux bords, il faut regarder ses composantes c'est-à-dire F_{invas} et F_{out} . Sur la Figure 3.26 on observe que F_{invas} qui dépend de la condition aux bords, et est plus importante quand le cylindre de PDMS est maintenu dans l'anneau ($r_{max}=R$). Ceci peut être également expliqué par la déformation de l'échantillon qui se bombe du fait de la sonde (dans la direction de déplacement) (Figure 3.24). Cette déformation est moins importante pour les PDMS rigides. Par conséquent pour le PDMS 30:1 la différence de F_{invas} , et de F_{in} , entre les différentes conditions aux bords est moins importante (Figure 0.19). Nous verrons cela plus en détail dans la partie discussion. La force F_{out} est également plus élevée pour les conditions aux bords $r_{max}=R$ (Figure 3.26).

3.3.5. Effet de la vitesse de déplacement de la sonde

Pour cette série d'expériences la vitesse a été variée de $3\mu\text{m/s}$ à $300\mu\text{m/s}$. Pour chaque vitesse les indentations ont été effectuées sur six échantillons de deux ratios de PDMS 40:1 et 10:1. Dans le cas de 40:1, les indentations ont eu lieu sur les échantillons petits ($3,5\text{cm} \times 1,75\text{cm}$) aux conditions $x_{max}=L$, et sur les grands ($8\text{cm} \times 2\text{cm}$) aux conditions $r_{max}=R$. Dans le cas de 10:1 les indentations ont eu lieu que sur les échantillons petits ($3,5\text{cm} \times 1,75\text{cm}$) aux conditions $x_{max}=L$.

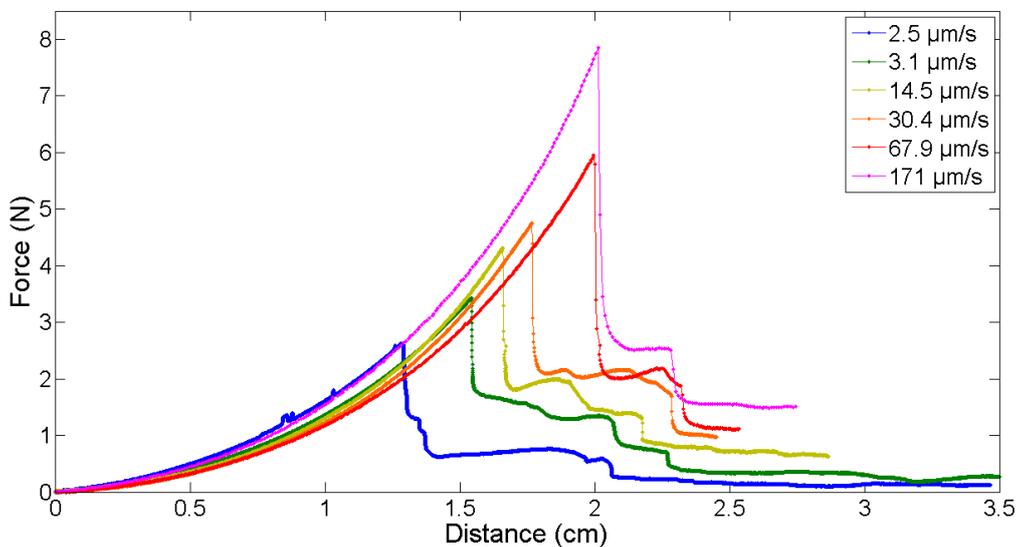


Figure 3.27 Les profils de la force d'indentation du PDMS 40:1 à différentes vitesses

Perforation des cylindres de PDMS 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur aux conditions de bord $x_{max}=L$.

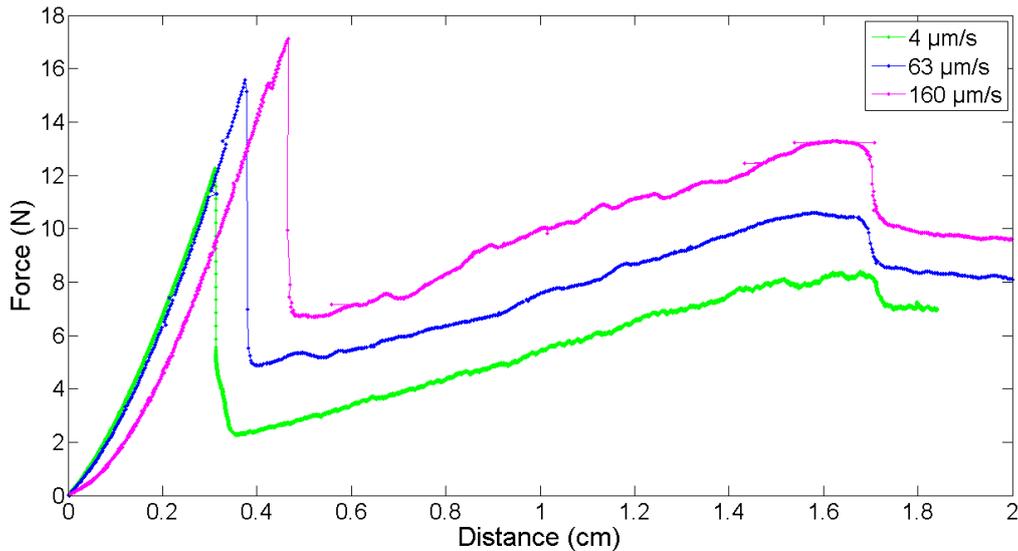


Figure 3.28 Les profils de la force d'indentation du PDMS 10:1 à différentes vitesses

Perforation des cylindres de PDMS 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur aux conditions de bord $x_{max}=L$.

Les profils de la force dépendent de la vitesse de l'indentation, plus l'indentation est rapide plus les forces (F_{crit} , F_{invas} , F_{out} , F_{in}) et la distance critique (d_{crit}) augmentent pour les PDMS 40:1 et 10:1 (Figure 3.27 et Figure 3.28). Les figures représentant la moyenne de des forces issues de plusieurs expériences montrent les mêmes tendances. Notamment, F_{invas} , F_{out} , F_{in} varient en fonction de la vitesse de perforation (Figure 3.29 et Figure 3.30 ; Annexes : Figure 0.20, Figure 0.21, Figure 0.22). La distance critique, d_{crit} , et la force critique, F_{crit} , montrent une légère dépendance pour le PDMS 40:1, mais pas pour 10:1 (Figure 3.31 et Figure 3.32 ; Annexes : Figure 0.23, Figure 0.24, Figure 0.25). Sur les Figure 3.27 et Figure 3.28, on observe que quand la tige avancement à 100-160μm/s pour le PDMS 40:1 et à plus de 40μm/s pour le PDMS 10:1 F_{in} atteint un plateau.

Nous discutons de ces résultats dans la partie discussion (3.4).

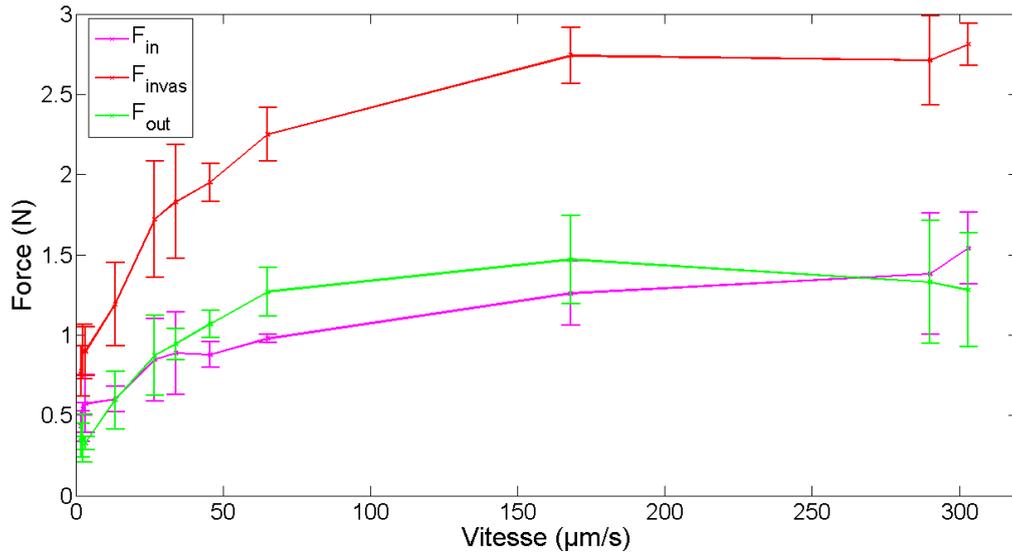


Figure 3.29 F_{invas} , F_{out} et F_{in} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 40:1

Perforation des cylindres de PDMS 40:1 avec les conditions aux bords $x_{max}=L$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente 3 $\mu\text{m/s}$ et 300 $\mu\text{m/s}$. Chaque point représente la valeur moyenne de 2 à 5 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

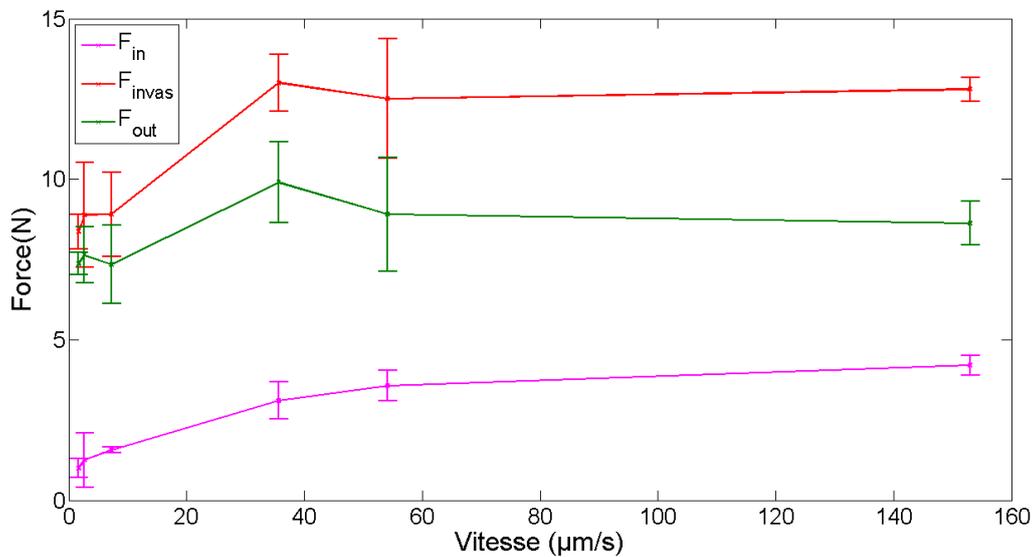


Figure 3.30 F_{invas} , F_{out} et F_{in} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 10:1

Perforation des cylindres de PDMS 10:1 avec les conditions aux bords $x_{max}=L$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente 3 $\mu\text{m/s}$ et 160 $\mu\text{m/s}$. Chaque point représente la valeur moyenne de 2 à 5 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

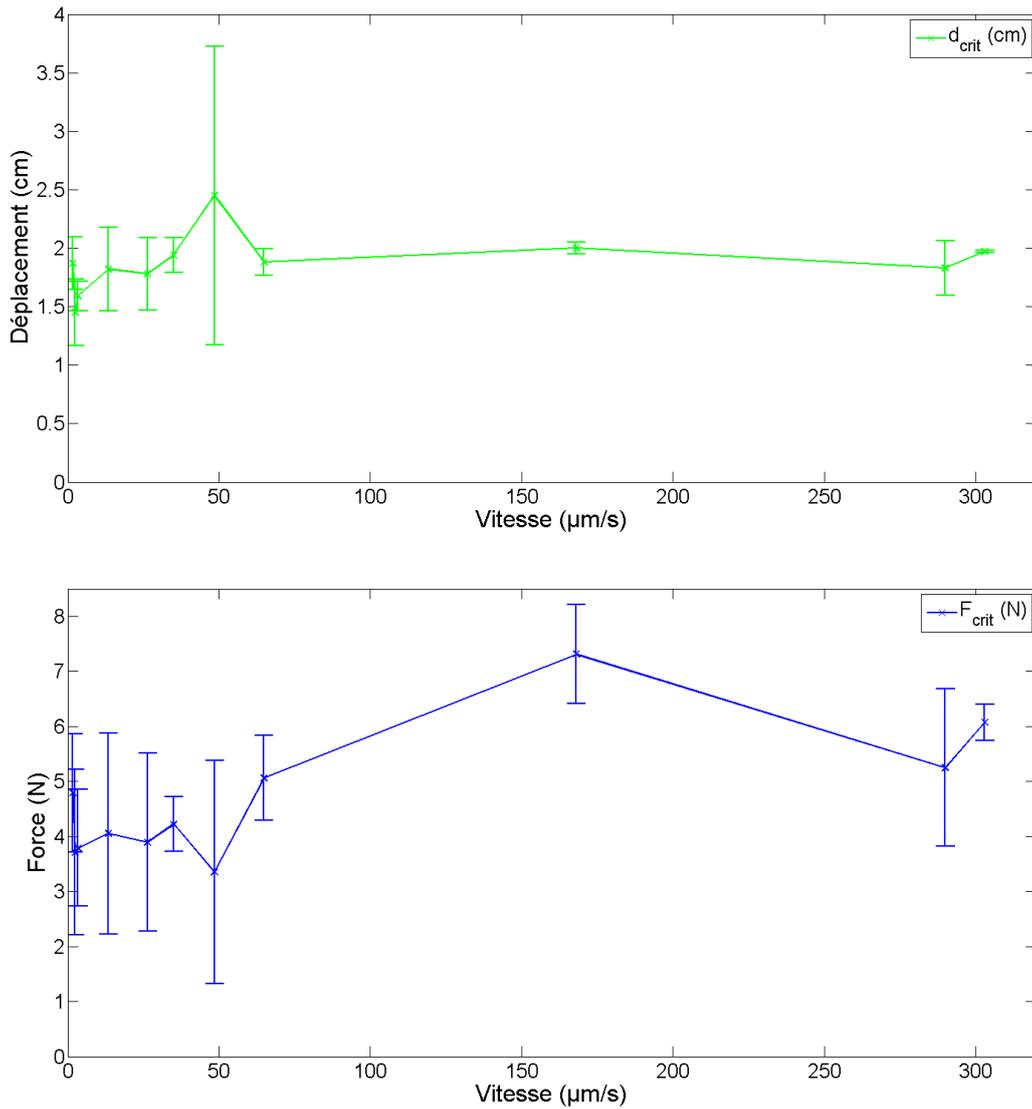


Figure 3.31 d_{crit} et F_{crit} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 40:1

Perforation des cylindres de PDMS 40 :1 avec les conditions aux bords $x_{max}=L$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $300\mu\text{m/s}$. Chaque point représente la valeur moyenne de 2 à 5 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

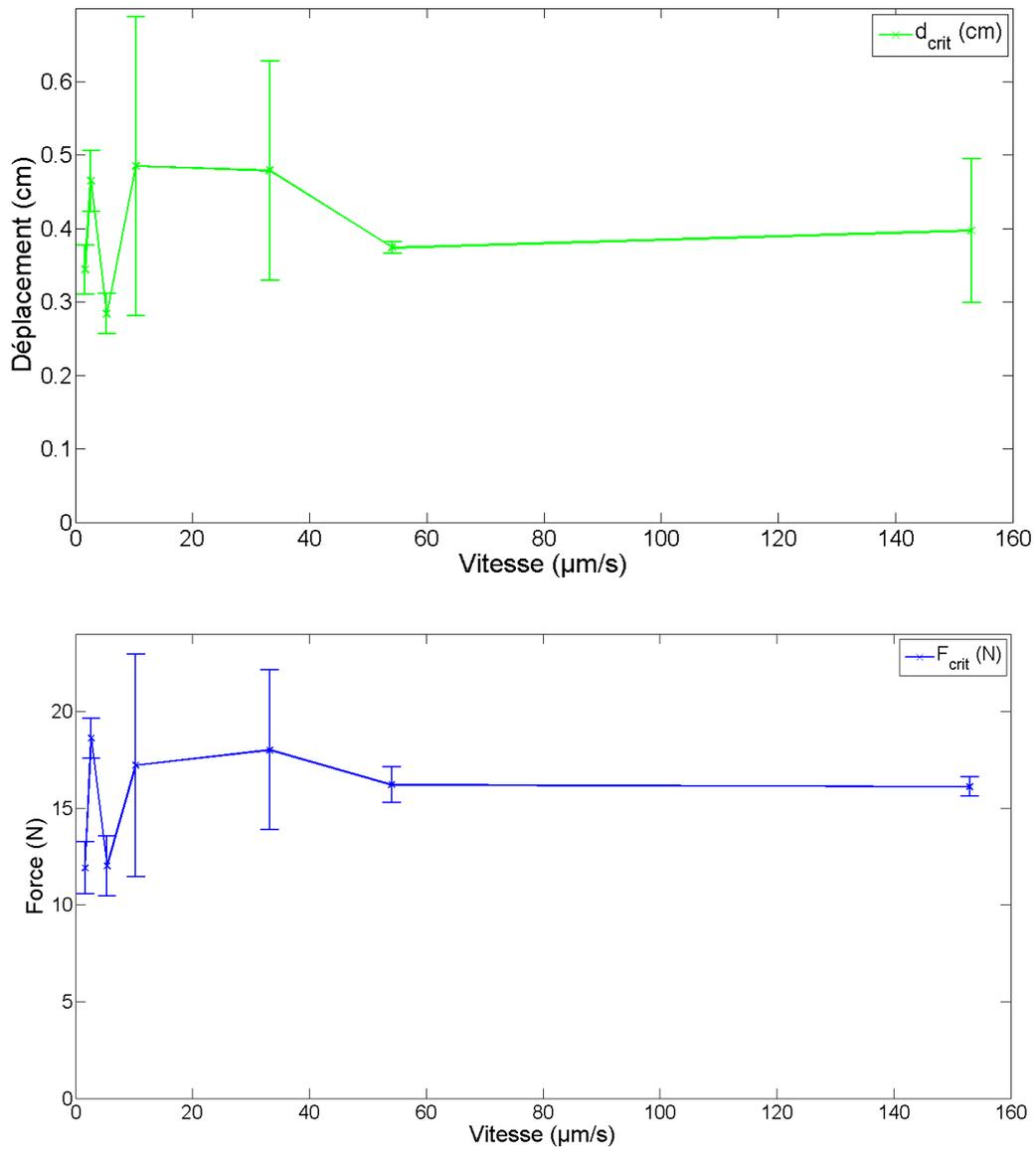


Figure 3.32 d_{crit} et F_{crit} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 10:1

Perforation des cylindres de PDMS 10 :1 avec les conditions aux bords $x_{max}=L$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente 3 µm/s et 160µm/s. Chaque point représente la valeur moyenne de 2 à 5 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

3.3.6. Effet de la géométrie de la sonde et de l'échantillon de PDMS

Rayon de courbure des sondes métalliques

Durant la thèse huit sondes, fabriquées à l'atelier mécanique du laboratoire, ont été utilisées, car avec l'usure elles flambaient et devenaient inutilisables. Toutes faisaient 1mm de diamètre, en acier. On peut voir la forme des pointes obtenues dans la partie Annexes : Figure 0.16. Dans la littérature (Kundan et Ghatak, 2018) il est connu que la géométrie de la pointe d'indentation est un paramètre important dans la détermination de la force nécessaire pour ouvrir une fissure (F_{crit}) et du déplacement ou distance critique (d_{crit}). Pour unifier toutes les données, il était nécessaire d'évaluer l'importance de la variation de la courbure des pointes qui n'étaient pas parfaitement hémisphériques. La Figure 3.33 montre F_{crit} et d_{crit} pour les différents ratios du PDMS mesurés par une sonde unique (bleu ciel et vert clair, respectivement), et la moyenne de toutes les mesures avec les huit différentes sondes (bleu marine et vert foncé, respectivement), avec leur écart-type respectifs. Pour limiter l'incertitude toutes les données représentées sur la figure sont issues des mesures dans les mêmes conditions, la vitesse d'indentation, la taille de l'échantillon et les conditions aux bords. On observe, que cela soit pour F_{crit} , d_{crit} ou F_{in} , que les valeurs issues des mesures avec une seule sonde sont très proches de celles des huit sondes. En prenant en considération notamment l'importance de l'écart-type même quand les mesures sont faites avec une seule sonde, on peut en déduire que la variation due aux autres paramètres (le mode de préparation des échantillons, les variations du temps et de la température de réticulation) est plus importante que celle due à la courbure de la pointe de sonde.

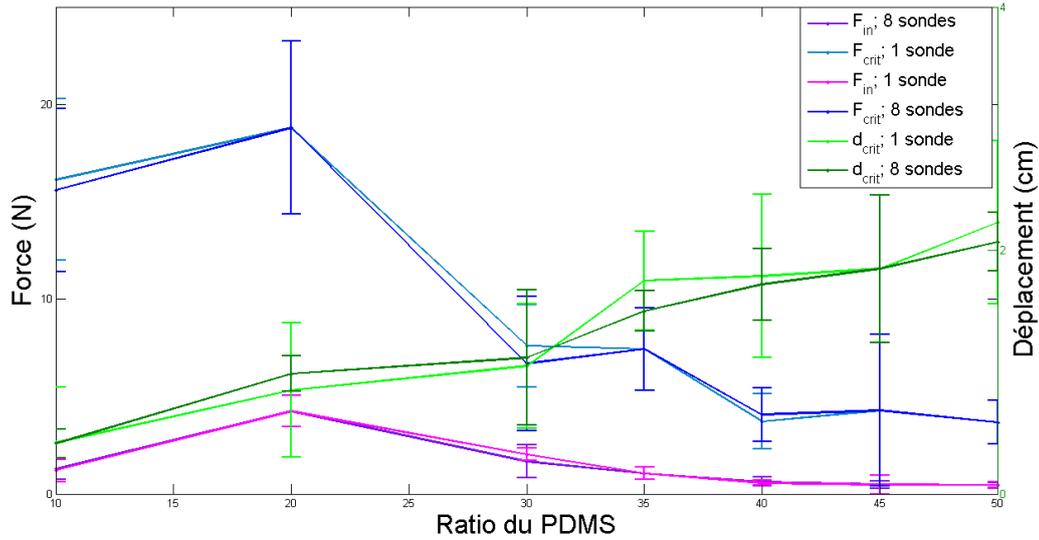


Figure 3.33 Les variations dues à la courbure de la pointe de sonde sont négligeables.

Perforation des cylindres de PDMS 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur, fixé par la surface inférieure du cylindre (échantillon $x_{max}=L$), avec des sondes en acier de 1mm de diamètre, avec une vitesse ente 3 $\mu\text{m/s}$ et 30 $\mu\text{m/s}$ avec une vitesse ente 3 $\mu\text{m/s}$ et 30 $\mu\text{m/s}$. Les valeurs de d_{crit} (vert foncé), F_{crit} (bleu marine) et F_{in} (violet) sont déterminé par huit différentes sondes, chaque valeur représente la moyenne de 3 à 15 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant. Les valeurs de d_c (vert), F_{crit} (bleu ciel) et F_{in} (magenta) sont déterminé par une unique sonde, chaque valeur représente la moyenne de 2 à 5 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

Taille des échantillons en PDMS

Nous présentons maintenant les résultats pour deux tailles de cylindres de PDMS (3,5cm de diamètre et 1,75cm de longueur et 8cm de diamètre et 2cm de longueur), dans les deux conditions aux bords ($r_{max}=R$ et $x_{max}=L$). La Figure 3.34 montre les valeurs de F_{crit} , F_{in} et d_c pour ces 4 configurations, pour du PDMS 40:1. On note pour la condition $r_{max}=R$ des valeurs supérieures de F_{in} et d_{crit} par rapport à la condition $x_{max}=L$. Les différences sont plus faibles pour F_{crit} . Pour le PDMS 30:1 (Figure 3.35) et d'autres ratios, on observe la même chose : La taille n'a pas de forte incidence, par contre la condition $r_{max}=R$ conduit à des valeurs plus grande de F_{in} et d_{crit} par rapport à la condition $x_{max}=L$, comme on a vu dans la partie 3.3.4 .

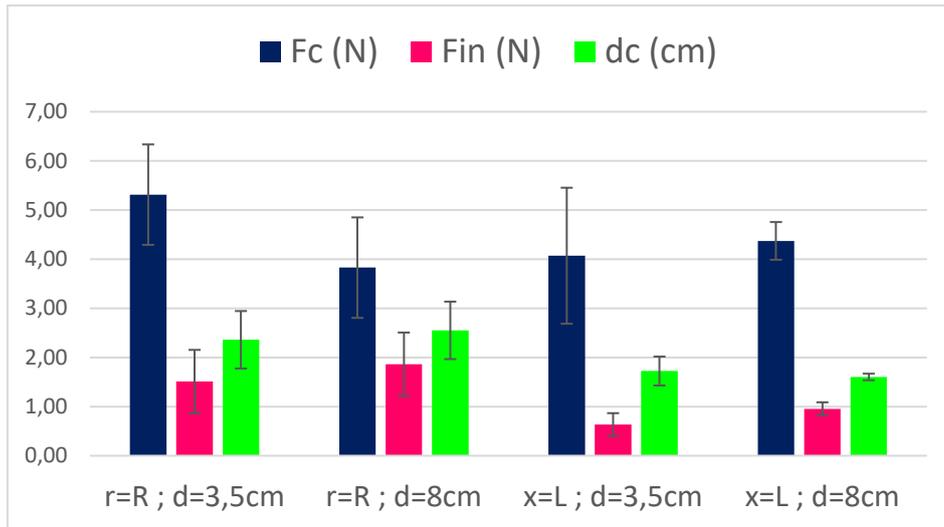


Figure 3.34 F_{crit} , F_{in} et d_{crit} pour des différentes tailles et des conditions aux bords de l'échantillon de PDMS 40:1

Perforation cylindres de PDMS 40:1 de 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur et dans les cylindres de PDMS 8cm de diamètre, 2cm de longueur, avec les conditions de bord $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, avec une vitesse ente $3 \mu m/s$ et $30 \mu m/s$ des. Chaque histogramme de d_{crit} (vert), F_{crit} (bleu) et F_{in} (magenta) déterminé par huit différentes sondes, représente la valeur moyenne de 3 à 15 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

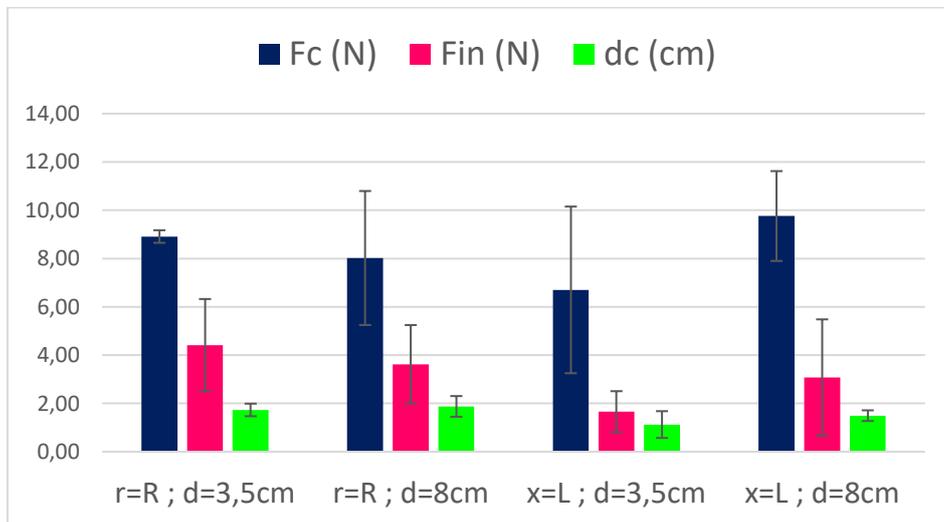


Figure 3.35 F_{crit} , F_{in} et d_{crit} pour des différentes tailles et des conditions aux bords de l'échantillon de PDMS 30:1

Perforation des cylindres de PDMS 30:1 de 3,5cm de diamètre, 1,75cm de longueur et dans les cylindres de PDMS 8cm de diamètre, 2cm de longueur, avec les conditions de bord $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, avec une vitesse ente $3 \mu m/s$ et $30 \mu m/s$. Chaque histogramme de d_{crit} (vert), F_{crit} (bleu) et F_{in} (magenta) déterminé par huit différentes sondes, représente la valeur moyenne de 3 à 10 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

3.4. Discussion

Dans cette partie, je résume les résultats obtenus sur le PDMS et je ferai un récapitulatif de ce qui sera retenu pour les expériences sur *Candida albicans* (au chapitre suivant).

3.4.1. Indentation

Les expériences d'indentation ont permis de tester la réponse jusqu'au moment de rupture d'élastomères de PDMS indentés par une tige métallique millimétrique. Pour la condition aux bords $r_{\max}=R$, on trouve un très bon accord avec la théorie proposée par Fakhouri et al. (somme de deux termes, linéaires et quadratiques, décrivant la réponse à faible et forte déformations). Celle-ci correspond au cas d'une pointe plate. L'accord est moins bon si l'on avait considéré le cas d'une pointe hémisphérique. Dans notre cas, les pointes sont de formes intermédiaires, elles présentent un rétrécissement puis une partie relativement plane sur leur extrémité. Au vu des différences attendues entre les deux formes extrêmes étudiées par Fakhouri et al, il paraît normal que pour nos formes intermédiaires, on puisse obtenir quelque chose de plus proche des pointes plates. L'accord avec des conditions aux bords $x_{\max}=L$ n'est pas bon, ce qui est cohérent car cela correspond à une équation différente pour les étirements qu'il reste à explorer du point de vue théorique. Cela montre la complexité du problème, en particulier pour l'application à *C. albicans*, donc le support de croissance correspondra à des conditions encore un peu différentes.

Un aspect très original de l'étude concerne l'effet de la vitesse, j'ai pu caractériser l'augmentation du module d'Young déduit des expériences d'indentation réalisée à des vitesses croissantes. J'interprète cela par la viscoélasticité du PDMS qui est sollicité à des temps caractéristiques plus faibles, ce qui correspond à des fréquences plus élevées, pour lesquelles le module est plus grand.

3.4.2. Force critique

Les mesures de force critique en fonction du ratio PDMS:réticulant ont permis de voir que celle-ci diminue assez rapidement avec le ratio, mais de manière originale avec l'exception du PDMS 10:1 qui présente une valeur plus faible que pour le 20:1. La mesure du déplacement critique, elle est cohérente et d_{crit} augmente constamment avec le ratio de manière relativement proportionnelle.

L'effet de la condition aux bords est faible mais visible : on note des valeurs légèrement plus importantes de F_{crit} pour la condition $r_{\max}=R$ que pour $x_{\max}=L$. Cette observation est cohérente avec le fait que d_{crit} est nettement plus important pour la condition $r_{\max}=R$. Si l'on considère que pour un même ratio, on s'attend à des valeurs cohérentes du module et de la forme de la courbe d'indentation, (propre à chaque ratio) si le d_{crit} augmente, on s'attend effectivement à ce que la force critique sera plus élevée aussi. Une explication au fait que le d_{crit} est plus élevé est que n'étant pas contraint en $x=L$, le PDMS peut se déformer à l'opposé de la tige, du coup le déplacement de la tige a beau être important, la déformation du PDMS n'est pas aussi forte. Alors que lorsqu'il est contraint en $x_{\max}=L$, dès que d augmente, la déformation est importante aussi.

La force critique en fonction du rayon de la sonde d'indentation, évolue quadratiquement ($\sim R^2$) si la pointe est plate et pour les pointes sphériques si le rayon est supérieur à un rayon critique R_c , qui représente la transition entre une fracture limitée par l'énergie et une limitée par la contrainte (Fakhouri et al., 2015). Cette valeur seuil pour les gels étudiés dans Fakhouri et al (2015) est de l'ordre de 1 mm. Malheureusement il était difficile avec notre dispositif de réaliser des expériences avec des diamètres plus réduits pour voir la transition éventuelle vers un régime limité par l'énergie pour la rupture. Dans ce régime, la force critique devient proportionnelle au rayon et non au rayon au carré. Cela a une importance pour le chapitre suivant et nous pouvons apporter deux réponses pour savoir quelle condition appliquer. La première c'est que pour une tige plate à son extrémité, on est toujours en régime limité par la contrainte, la loi $F_{crit} \sim R^2$ est toujours vérifiée. Nous avons vu que pour l'indentation, même si nos formes de pointe ne sont ni plates ni hémisphériques, le comportement observé correspond néanmoins plus aux pointes plates. Une deuxième justification à l'hypothèse que l'on va faire sera apportée par l'expérience et les valeurs de forces que cela induirait si l'on était dans le régime de force critique proportionnel au rayon. On supposera donc le régime limité par la contrainte est que la force F_{crit} est proportionnelle à $\sigma_c R^2$ et donc l'on peut mettre à l'échelle de *C. albicans* par un simple calcul en considérant σ_c constante.

De même que pour l'indentation, j'ai pu voir l'effet de la vitesse de la pointe sur la force critique. On constate que celle-ci est très différente selon le ratio. Pour les ratios faibles comme 10:1, on mesure, en moyenne, une absence de variation. Pour les ratios plus élevés, comme 40:1, on note une variation modérée, avec une augmentation de l'ordre de 50 % sur le domaine exploré de 3 à 300 $\mu\text{m/s}$. La valeur de d_{crit} semble augmenter de manière encore plus faible. L'effet observé peut donc être uniquement lié à l'augmentation du module d'Young comme observé lors de l'indentation.

3.4.3. Perforation

La perforation est la 3^{-ème} phase après l'indentation et la rupture. Cette phase est la plus originale et celle qui a fait l'objet de très peu voire aucune étude dans la littérature. Une fois le PDMS déformé puis la force critique atteinte, dans toutes les expériences, on observe une chute de la force mais celle-ci ne devient pas nulle. Lorsque l'on continue l'indentation, selon le ratio, les conditions aux bords, la vitesse on observe plusieurs comportements jusqu'à ce que la tige ressorte du PDMS, ce qui est aussi une situation originale : nous sommes allés jusqu'à mesurer la valeur de la force lorsque la tige continue son mouvement hors du PDMS. Des études ont été menées sur des membranes, notamment pour applications aux gants de protection (Nguyen et al., 2004), mais pas sur des échantillons en volume comme ici.

J'ai décidé d'extraire des données des valeurs simple des forces : 1) la force pendant la pénétration (ou invasion) appelée F_{invas} qui était constante ou présentait une lente augmentation (« pente ») avec la distance de pénétration d . Puis 2) : la force F_{out} , une fois la tige complètement sortie de l'échantillon. La différence entre ces deux forces (en prenant la valeur maximale de F_{invas} M) a été appelé F_{in} . Je commence par discuter les résultats pour F_{out} (qui est plus simple), puis F_{invas} .

F_{out}

La force F_{out} est la seule qui reste après avoir perforé tout le PDMS, il n'y a donc plus de composante liée à la rupture du matériau, ce qui peut expliquer déjà que sa valeur est constamment décroissante avec le ratio de PDMS. Le fait que la force F_{crit} soit plus élevée pour le ratio 20:1 par rapport au ratio 10:1 est lié à une force nécessaire plus grande pour assurer la rupture du PDMS qui n'intervient pas pour F_{out} , ainsi F_{out} est constamment décroissante avec le ratio de PDMS. Il ne reste uniquement que le frottement de la tige sur le PDMS. Cette force est a priori proportionnelle à la surface de contact multipliée par la contrainte de cisaillement τ soit $F_{frottement} = \tau 2\pi RL$. Avec L la longueur totale de l'échantillon. Pour ce qui est de la vitesse, pour les faibles ratios (10:1 en particulier), F_{out} augmente que très légèrement avec la vitesse, ainsi on peut supposer que la contrainte de cisaillement est constante et on est proche d'un cas de frottement solide avec une contrainte tangentielle indépendante de la vitesse. On peut supposer que l'on a un coefficient de frottement μ , rapport de la contrainte tangentielle sur la contrainte normale. Cela permet d'expliquer que la force F_{out} est plus élevée pour les conditions aux bords $r_{max}=R$. C'est dans cette configuration, qu'étant contraint radialement, la contrainte normale est plus importante, à coefficient de frottement fixé, cela augmente la contrainte tangentielle et donc le terme de frottement.

Pour les ratios plus importants, on observe que F_{out} varie plus significativement avec la vitesse, augmentant d'abord rapidement avec la vitesse puis atteignant un plateau. Cela signifie que le frottement est cette fois mixte entre un frottement de type visqueux (qui augmenterait linéairement avec la vitesse) et un frottement solide. Aux grandes vitesses, on retrouve le comportement du PDMS à 10:1 : la force de frottement ne dépend plus de la vitesse. Lorsque le ratio augmente, les modules augmentent et pour une déformation donnée, cela génère une contrainte normale plus importante sur la tige et donc une contrainte tangentielle plus forte aussi et un frottement plus fort. La nature exacte de l'aspect visqueux du frottement peut avoir plusieurs sources : liée aux chaînes libres non réticulés, aux phénomènes d'adhésion, à la viscoélasticité du PDMS. Ce dernier point est un bon candidat sachant qu'il a été observé que le coefficient de frottement dans le cas où on a un frottement sec d'élastomère peut se voir augmenter linéairement avec la vitesse puis saturer.

 F_{invas}

F_{invas} présente à la fois une contribution due au terme de frottement vu avec F_{out} mais sur une longueur réduite l (et non L) et une contribution liée au phénomène de rupture du PDMS. On écrit ainsi comme on l'a vu précédemment, (Shin et al., 2007), on peut définir F_{invas} comme:

$$F_{invas} = F_{fracture} + F_{frottement} = \sigma\pi R^2 + \tau 2\pi Rl \quad (3.1)$$

Où le premier terme est la force nécessaire pour ouvrir une fissure et le second est la force de frottement associée au déplacement de la sonde dans le PDMS, avec τ la contrainte de cisaillement, et σ la contrainte d'ouverture de fissure après la pénétration dans du PDMS. Pour déterminer la contrainte d'ouverture de fissure, σ , il suffit de soustraire F_{out} , que l'on considère égale à $F_{frottement}$.

On a noté $F_{in} = F_{invas} - F_{out}$. On verra dans la partie suivante que cette grandeur est la plus importante pour l'étude de *C. albicans*.

En faisant cette soustraction, on élimine la composante de frottement et on obtient F_{in} , la force associée à l'ouverture de fissure, qui, elle aussi augmente avec la vitesse de perforation avant d'atteindre un plateau. Le mécanisme physique qui fait que la force d'ouverture de fissure dépend de la vitesse de perforation n'est pas discuté dans la littérature sur cette problématique de perforation en particulier. Je propose que plus la tige avance rapidement dans le PDMS, moins les chaînes polymériques ont le temps de se réorganiser, plus l'énergie nécessaire pour la propagation de la fissure à apporter est grande.

La question qui reste à explorer est donc de savoir l'importance de la propagation d'un front de fissure en avant de la tige et comment évolue la force de fracture au fur et à mesure de l'avancement dans le PDMS. Si la sonde avance plus rapidement que la propagation du front de la fissure, on peut imaginer que cela conduira à une valeur plateau de F_{in} . On atteint un tel plateau pour une sonde avançant à 100-160 $\mu\text{m/s}$ pour le PDMS 40:1 et à plus de 40 $\mu\text{m/s}$ pour le PDMS 10:1.

Pour la partie frottement, la longueur à considérer est la longueur sur laquelle le PDMS est en contact avec la tige (l), qui est égale à la différence entre la position de la tige (d) et celle du bord du PDMS au niveau du point d'entrée de tige. Cette longueur va donc être variable selon les expériences. On peut tout de suite voir qu'elle est liée à d_{crit} . Ainsi quand d_{crit} est faible, pour une faible déformation du PDMS, la tige pénètre dedans et la longueur à considérer est de l'ordre de d qui augmente jusqu'à L . Lorsque d_{crit} est important, cela va dépendre de la relaxation de la déformation du PDMS qui va revenir en arrière le long de la tige. Si ce phénomène est important, dès les premiers instants après la rupture, la distance de la tige à l'intérieur du PDMS peut être déjà très grande, si d_{crit} est de l'ordre de L (cas extrême), la longueur peut tout de suite avoir une valeur proche de L et celle-ci va peu augmenter jusqu'à L . On peut donc expliquer que plus le ratio du PDMS est grand, plus d_{crit} est grand et plus la plage d'augmentation du terme de frottement va être faible : F_{invas} est donc presque constante pour les grands ratios.

La discussion sur la force de frottement pour F_{out} est la même pour la partie frottement de F_{invas} . Donc s'ajoute à l'effet « pente », qui explique que l'on ait une pente faible ou forte pour F_{invas} , le fait que la valeur du frottement par unité de longueur est lui aussi plus fort lorsque le ratio augmente, comme on l'a expliqué, donc le niveau de base de la force de frottement est plus élevé pour les ratios grands et présentera une pente en fonction de d plus grande.

3.4.4. Memento pour *C. albicans*

PDMS purement élastique à faible déformation

J'ai observé que pour de faibles déformations la composante visqueuse de module d'Young est négligeable par rapport à la composante élastique, on peut donc considérer le polydiméthylsiloxane (PDMS) comme purement élastique. Sachant que l'hyphe de *C. albicans* est microscopique (diamètre $\sim 2\mu\text{m}$), on peut affirmer que le filament va combattre une force de rappel purement élastique lors de l'invasion dans le PDMS.

F_{in} la force nécessaire pour ouvrir la fissure

Le calcul $F_{in}=F_{invas}-F_{out}$ nous permet d'éliminer la composante de frottement et de ne garder que la composante de l'ouverture de fissure. A l'échelle de *C. albicans* l'on considère que la force de frottement (statique et dynamique) est négligeable, car la croissance ne se produit qu'à l'apex (chapitre 1.1), le reste de l'hyphe est immobile.

Force proportionnelle à la surface de la section transversale

L'objectif est de déterminer la valeur de la force critique, F_{crit} et celle de la force nécessaire pour ouvrir la fissure, F_{in} , à l'échelle de *C. albicans*. En considérant PDMS purement élastique aux faibles déformations et en supposant que la force F_{crit} est proportionnelle à $\sigma_c R^2$, l'on peut les mettre à l'échelle de *C. albicans* par un simple calcul en considérant σ_c constante. Ainsi on peut obtenir une force appliquée par le PDMS sur un hyphe invasif, ce qui sera fait dans le chapitre suivant.

Il faut noter que F_{crit} et F_{in} sont plus importantes dans la condition $r_{max}=R$ (que dans la condition $x_{max}=L$) et augmentent en fonction de la vitesse de perforation. Pour ne pas surestimer la pression de turgescence (en surestimant les forces F_{crit} et F_{in}) il faut prendre des valeurs de F_{crit} et F_{in} , issues des mesures sur les cylindres de PDMS dans la condition $x_{max}=L$ (ce choix sera renforcé par d'autres arguments dans le chapitre 4), avec la vitesse de perforation 20% de diamètre de la sonde par minute.

La Figure 3.36 montre les valeurs de F_{crit} et F_{in} à prendre pour l'estimation de la force résistive rencontrée par *Candida albicans*, ce qui va ensuite me permettre de calculer la pression de turgescence dans le chapitre 4.

Le front de fissure se propage

L'hypothèse (la force résistive appliquée par le PDMS évolue linéairement en fonction de la surface de la section transversale de l'objet pénétrant) peut s'effondrer si le matériau oblige l'indentateur à exercer une force continue pour ouvrir la fissure, c'est-à-dire si le front de la fissure ne se propage pas en avant de la pointe de la sonde. L'hypothèse que pour le PDMS 40:1 le front de fissure se propagent à 100-160 $\mu\text{m/s}$, nous permet de supposer que le front de fissure lors de l'invasion de *C. albicans* se propagent également.

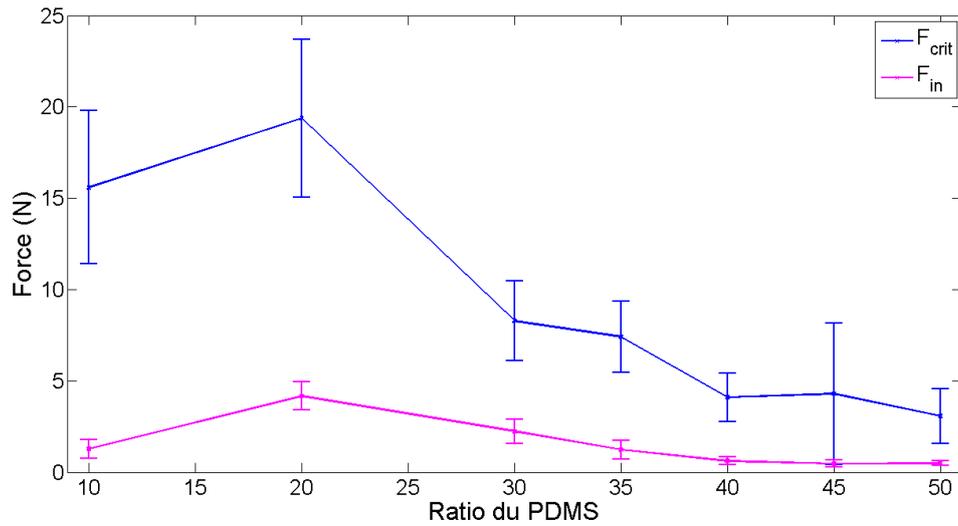


Figure 3.36 Les valeurs de F_{crit} et F_{in} à prendre pour l'estimation de la force résistive rencontrée par *Candida albicans*

Perforation des cylindres de PDMS, de diverses tailles, aux conditions de bord $x_{max}=L$, avec la sonde en acier de 1mm de diamètre, avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $30\mu\text{m/s}$. Les valeurs de F_{crit} (bleu) et F_{in} (magenta) représentent la moyenne de 4 à 20 mesures, effectuées par des différentes sondes, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

4. Résultats et discussion *C. albicans*

Afin de pénétrer un substrat résistif, les filaments de *Candida albicans* doivent exercer une force. Comment font-ils ? Les filaments fongiques sont des structures pressurisées, contenues par une paroi cellulaire. La turgescence est le résultat d'un déséquilibre osmotique entre la cellule et l'espace extracellulaire. La force exercée par le filament résulte d'une combinaison de turgescence et de rigidité de la paroi. Par exemple, pour une valeur donnée de pression de turgescence, si la paroi s'étend, la cellule peut croître et exercer une force dans le sens de la croissance. Inversement, pour la même valeur de pression de turgescence, une paroi cellulaire infiniment rigide empêcherait la croissance et la cellule n'exercerait aucune force sur l'environnement.

4.1. Changements de morphologie induits par la force mécanique

La croissance polarisée, qui se traduit en extension du filament hyphal au niveau de l'apex, permet à *Candida albicans* d'explorer son environnement. Campas et Mahadevan ont modélisé la variation de la forme des cellules en croissance hyphale en utilisant la pression de turgescence, les propriétés élastiques de la paroi cellulaire et le taux de sécrétion (Campas et Mahadevan, 2009). Cependant, on sait peu de choses sur la réponse aux contraintes mécaniques des cellules en croissance filamenteuse. *Candida albicans* pénètre dans les tissus de l'hôte et il est probable qu'ils subissent une contrainte de compression lors de la pénétration et de la croissance invasive ultérieure. En plus de la pénétration, la croissance dans un environnement spatialement confiné est essentielle pour l'infection et la dissémination de ce pathogène fongique.

La pénétration du tissu de l'hôte est critique pour *C. albicans* et nécessite non seulement la génération d'une force suffisante, mais aussi l'adhésion aux cellules hôtes pour contrer cette force, c'est-à-dire avoir un appui pour la rendre efficace (Lew, 2011 ; Mendgen *et al.*, 1996). Les champignons pathogènes des plantes et de l'Homme ont des pressions de turgescence de l'ordre du MPa et, pour les pathogènes de l'Homme, cette pression de turgescence dépasse la résistance des cellules hôtes à la pénétration. De telles cellules ont des modules élastiques qui se situent dans la plage de 1 à 100 kPa (Akhtar *et al.*, 2011 ; Alonso et Goldman, 2003). Mais il serait plus pertinent de parler de la contrainte critique pour caractériser la rupture du matériau, lors de l'invasion de *C. albicans* dans les tissus (Basmacıyan *et al.*, 2019 ; Richardson *et al.*, 2018 ; Westman *et al.*, 2019). Cet aspect est important et a motivé la partie physique de notre étude avec l'expérience analogique de pénétration d'une sonde cylindrique dans du PDMS. *C. albicans* peut envahir les cellules via l'endocytose induite par l'hôte et / ou la pénétration active, la pénétration active étant la principale voie d'invasion des épithéliums intestinaux. D'autre part, une étude a montré que l'apex des hyphes de *C. albicans* est positionné avec une morphologie « nez en bas » pendant la croissance sur une surface rigide, et que la croissance perpendiculaire et le contact avec une surface rigide entraînent une indentation de la matière (Thomson *et al.*, 2015).

Grâce à une collaboration pluridisciplinaire, la relation entre la rigidité du substrat et la pénétration / croissance invasive de *C. albicans* a été étudiée (Annexes : Puerner et al., 2020). Je présente dans ce chapitre les trois types d'expériences réalisées avec *C. albicans* : *observations de morphologie et mesures de vitesses de croissance invasive de la souche sauvage (1)*, *observations de l'altération de la paroi cellulaire par utilisation d'un mutant de la β -1,3 glucane synthase (2)* et *d'un agent anti-fongique (3)*. Le premier type d'expérience a été conduit avec Charles Puerner (doctorant à l'institut Biologie de Valrose) qui a assuré la partie imagerie, je me suis occupée de la préparation et la caractérisation physique des échantillons, pour ensuite conduire la partie analyse et mesure de la pression de turgescence. J'ai assuré pour les deux autres types d'expériences à la fois la partie préparation biologique, préparation des échantillons, imagerie et analyse.

4.1.1. Les modes de croissance en fonction de la rigidité du substrat

Croissance filamenteuse de Candida albicans dans des puits micro-fabriqués

Pour étudier la croissance hyphale de *C. albicans*, nous avons employé la micro-fabrication avec des élastomères de polydiméthylsiloxane (PDMS) qui, en particulier, a été récemment utilisé comme capteur de force (Minc et al., 2009). Des membranes en PDMS, avec environ 10^5 micropuits de forme cylindrique avec un diamètre de 10 μm une profondeur de 5 μm et un espacement de 15 μm entre les chambres adjacentes, ont été générées (Figure 4.1A). Les cellules de *C. albicans* dans des matrices de puits micro-fabriquées en PDMS ont été visualisées avec des microscopes inversés ; l'imagerie a été faite à travers la membrane de PDMS de 150 à 200 μm d'épaisseur. La Figure 4.1B montre un balayage de réfraction confocale XZ à travers le PDMS avec les puits et les milieux en haut (position la plus élevée) et la lamelle servant de support (un zoom des puits est illustré Figure 4.1C). Les cellules de *C. albicans* ont été mélangées avec du sérum de veau fœtal (FCS), ajoutées à la matrice PDMS et incubées pendant ~ 1 heure, puis la croissance filamenteuse a été suivie (Figure 4.1D). Avec du PDMS de faible rigidité (40 : 1), deux modes de croissance filamenteuse prédominent : croissance non invasive en surface et croissance invasive dans le PDMS (Figure 4.1E et F). En examinant le plan focal de la surface du PDMS et les hyphes, la croissance non invasive à la surface peut être distinguée de la croissance invasive, en observant si l'extrémité du filament est sur ou dans le PDMS. La croissance invasive a été confirmée en marquant la surface du PDMS et les cellules filamenteuses. En outre, nous avons observé que la partie blastospore (cellule ronde) des cellules filamenteuses dans les micropuits poussait contre la paroi du puits lors de la pénétration du filament dans le PDMS et que le filament se déformait fréquemment dans le PDMS, probablement en raison de la force résistive pendant la croissance invasive (Figure 4.1F et Figure 4.2A). Ces résultats indiquent qu'en plus d'avoir des propriétés optiques idéales, le PDMS est compatible avec la croissance filamenteuse de *C. albicans*.

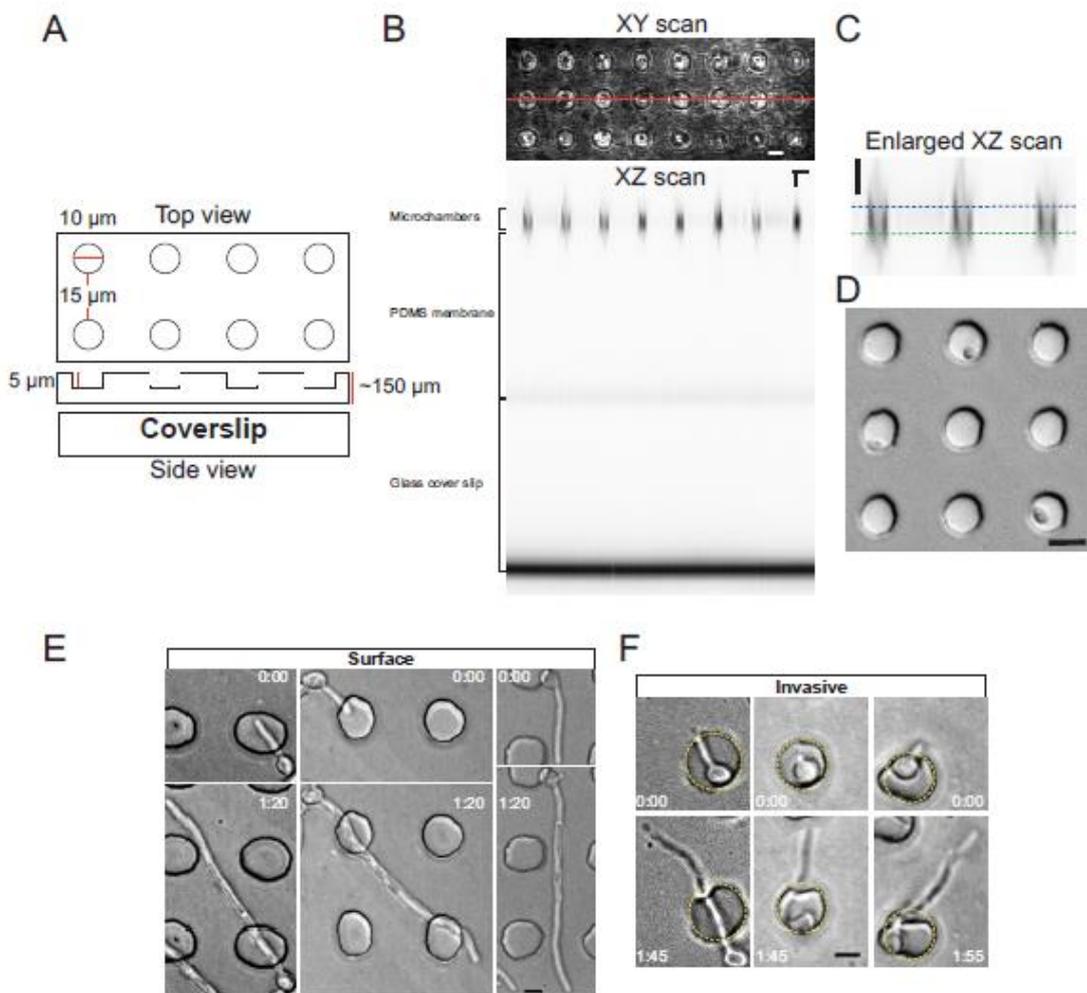


Figure 4.1 Croissance filamenteuse dans et sur le PDMS.

A) Schéma du réseau de micropuits de PDMS. Les vues de dessus et de côté sont illustrées avec les dimensions indiquées. B) Caractérisation du réseau de micropuits de PDMS. Le plan XY par l'observation en transmission et le plan XZ par l'observation en réflexion confocale d'un PDMS vertical monté sur une lamelle. Les barres mesurent 10 µm en XY et XZ. C) Balayage XZ des micropuits de PDMS agrandie. Microscopie à réflexion confocale XZ de 3 microchambres avec des lignes pointillées, indiquant le haut et le bas du puits. La barre est de 10 µm. D) Micropuits de PDMS avec des cellules *C. albicans* piégées. Des cellules de *C. albicans* ont été mélangées avec le sérum (75%) et ajoutées au réseau de micropuits de PDMS et l'image DIC est présentée. La barre est de 10 µm. E) Croissance filamenteuse non invasive sur des réseaux de microchambres de PDMS. Images DIC de croissance sur surface de PDMS à partir de 3 expériences indépendantes sur PDMS 40:1, avec des temps indiqués (h:min). F) Croissance filamenteuse invasive dans les puits de PDMS. Images DIC de croissance dans PDMS à partir de 2 expériences indépendantes utilisant PDMS 40:1 avec les temps indiqués. La chambre PDMS initiale est délimitée par une ligne jaune en pointillé pour mettre en évidence la déformation lors de l'extension invasive du filament. (C. Puerner)

Les modes de croissance dépendent de la rigidité du substrat

La croissance filamenteuse de *C. albicans* dans du PDMS de rigidité différente a été suivie en faisant varier le rapport du polymère au réticulant. Deux modes de croissance ont été observés à partir de cellules initialement dans des puits : la croissance invasive, qui prédominait avec un PDMS moins rigide (40: 1) (Figure 4.2A) et une flexion du filament dans les puits plus rigides (30: 1), qui était principalement situé sous l'apex (Figure 4.2B, panneau supérieur). Contrairement à *Schizosaccharomyces pombe* (Minc et al., 2009), une déformation importante des puits n'a pas été observée avec *C. albicans*, ce que nous attribuons aux différentes tailles, géométries et modes de croissance de ces champignons ; la levure de fission a un rayon de $\sim 2 \mu\text{m}$, comparé aux filaments d'hyphe de *C. albicans* avec un rayon de $\sim 1 \mu\text{m}$ (Sevilla et al., 1986 ; et nos observations), ce qui résulte en une surface transversale 4 fois plus petite. Une légère déformation de la chambre a été observée avec *C. albicans*, quand les cellules sortaient des puits de PDMS rigide ou quand elles pénétraient le PDMS très peu rigide. Parfois, à une rigidité intermédiaire, des cellules filamenteuses en croissance sur la surface du PDMS qui semblaient sonder la surface « nez en bas » ont été observées (Figure 4.2B, panneau inférieur), comme rapporté précédemment (Thomson et al., 2015). Ces filaments se déformaient et / ou se courbaient sous l'apex à chaque tentative, avant que la pointe de l'hyphe « rebondisse ».

Lorsque les filaments croissent dans le PDMS, ils ne le font pas en ligne droite, et adoptent des formes plus ou moins courbées. Pour clarifier la description et la compréhension de ce phénomène, nous définissons ici deux « façon » pour le filament d'être déformé :

- Le flambage est défini comme le changement immédiat de forme d'un élément allongé sous charges opposées selon son axe, c'est-à-dire le changement de forme du filament en raison des forces physiques qu'il subit, qui doivent revenir à leurs formes initiales une fois que les forces externes sont levées.
- La flexion subapicale est définie comme un changement de direction de croissance résultant en des filaments courbés (Figure 4.2C), ces changements de forme ne dépendent pas forcément des forces mécaniques appliquées et ne sont pas réversibles. Le flambage peut se produire avec un filament ayant déjà subi une telle flexion.

La Figure 4.2D montre qu'avec l'augmentation de rigidité du PDMS (de 50 : 1 à 30 : 1), il y a une augmentation du pourcentage de cellules subissant une flexion concomitante avec une diminution de cellules envahissant le PDMS. Au cours de la croissance invasive, un flambage du filament (Figure 4.2A et C) a été fréquemment observé. La Figure 4.2E montre que ce flambage dépend de la rigidité du PDMS, avec plus de la moitié des filaments invasifs flambant dans les deux substrats les plus rigides. Il est intéressant de noter que l'emplacement des sites de division cellulaire semble être affecté par le flambage du filament ; il y a une forte corrélation entre site de division et site du flambage. La formation des septums a été observée en moyenne 47 ± 20 min après le flambage (Figure 4.5). Il a été démontré que les septines sont enrichies préférentiellement aux endroits de forte courbure, aux points de ramification, dans les hyphes d'*Ashbya gossypii* (Bridges et al., 2016). Une hypothèse intéressante est que l'emplacement du site de division cellulaire peut minimiser la contrainte physique sur le filament, ou vice versa.

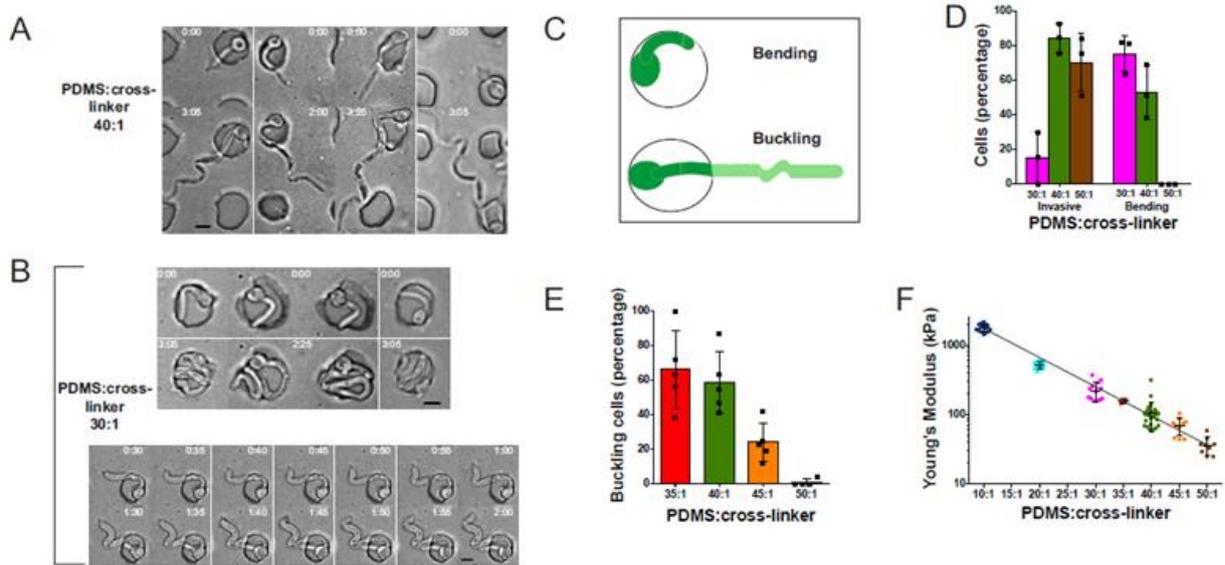


Figure 4.2 Flexion subapicale ou flambage du filament lors d'une croissance invasive ou d'un confinement dans des puits de PDMS.

A) Flambage du filament pendant la croissance invasive. Images DIC de cellules en croissance dans le PDMS aux temps indiqués. B) Flambage du filament lors du confinement dans des puits rigides de PDMS. Cellules piégées dans la chambre de PDMS aux temps indiqués visualisées par DIC (panneau supérieur). Suivi en temps réel d'une cellule en croissance sur du PDMS, sondant la surface (flexion subapicale, panneau inférieur) suivi par le flambage et la relaxation du filament, aux temps indiqués. C) Schéma des cellules en flexion et flambage, un vert plus clair indique la partie dans le PDMS. D) L'invasion de PDMS et la flexion du filament sont inversement corrélées. Trois expériences indépendantes de suivi en temps réel ont été réalisées aux ratios de PDMS indiqués, avec $n = 10-70$ cellules par expérience (80-140 par condition). La courbure du filament lors du contact ou de la pénétration du PDMS a été notée comme une flexion. Les barres indiquent l'écart-type et les points indiquent la moyenne expérimentale ($n = 20$ à 60 cellules par expérience et 90 à 140 par condition). E) Le nombre de filaments flambés augmente avec l'augmentation de la rigidité du PDMS. Des expériences indépendantes de suivi en temps réel (4-5) ont été réalisées aux ratios de PDMS indiqués, avec $n = 20-50$ cellules invasives par expérience (90-125 par condition). Les barres indiquent l'écart-type et les points indiquent les moyennes expérimentales. Les filaments invasifs sont considérés comme flambant si l'angle du filament est de 90° ou plus, par rapport à la pointe du filament. Noter qu'aucun flambage n'est observé dans les filaments se développant à la surface du PDMS. F) Module de Young des préparations de différents ratios de PDMS. Le module de Young a été déterminé par viscoanalyseur (DMA) pour 10 à 30 préparations. (C. Puerner)

Pour déterminer les propriétés mécaniques des différentes préparations de PDMS, l'analyse mécanique dynamique a été utilisée, comme décrit dans le chapitre précédent, car elle était reproductible sur une plage de rigidité de PDMS. Le module de Young de différents rapports de PDMS : réticulant sont en bon accord avec les valeurs publiées (Demichelis *et al.*, 2013 ; Xie *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014). La rigidité des échantillons aux ratios faibles (10:1 et 20:1), intermédiaires (30:1 à 40:1) et élevés (45:1 et 50:1) était similaire respectivement à celle des implants médicaux en silicone (Feng *et al.*, 2017) , avec un module de Young autour de 1 MPa, des tissus rigides tels que le myocarde (Mathur *et al.*, 2001), avec un module de

Young $\sim 0,1-0,2$ MPa, et des tissus moins rigides tels que les épithéliums (Akhtar et al., 2011 ; Alonso and Goldmann, 2003), avec un module de Young $\sim 40-70$ kPa.

4.1.2. L'effet de la force résistive sur la morphologie et l'extension de l'hyphe

Pénétration et évasion du PDMS

Étant donné que la pénétration active est critique lors du processus d'invasion de l'épithélium par *C. albicans* (Basmaciyan et al., 2019 ; Richardson et al., 2018 ; Wilson et al., 2016), ce processus dans le PDMS a été examiné plus en détail.

La Figure 4.3A montre une cellule filamenteuse qui a pénétré dans le PDMS après 0:04 (h: min) (II ; la situation I, avant que le filament ne soit en contact avec la paroi du puits, n'est pas illustrée), qui s'est ensuite développée de manière invasive (0:08-1:18 ; III), a déformé le puits adjacent (1:22 - 2:02; IV), entraînant une invagination dramatique, est sortie du PDMS dans le puits adjacent à 2:04 (V), suivi d'une pénétration dans la face opposée du puits à 2: 08 (VI) et croissance invasive (2:08 - 3:00; VII). La force résistive révélée par le flambage du filament, ainsi que la déformation du puits d'origine pendant la croissance invasive initiale (III), augmente probablement lors de la déformation et de la pénétration dans le puits adjacent (IV), la déformation (entre 1:22 - 2:02), résultant en un filament en forme de S (Figure 4.3A). La tension sur le filament est relâchée lors de la sortie du PDMS dans le puits adjacent (V), car la pointe du filament semble sauter vers l'avant (2:04). La force résistive de l'étape finale de croissance (VII) a également entraîné un flambage du filament (partie dans le puits) conduisant à une forme en M (2:42 - 3:00). Cette évasion du PDMS est analogue, à certains égards, aux filaments sortant d'un macrophage (McKenzie et al., 2010 ; Westman et al., 2018). Une telle évasion du PDMS a été observée un certain nombre de fois et la Figure 0.26 montre de tels exemples dans différentes rigidités de PDMS (40:1, 110 kPa; 35:1, 150 kPa; et 30:1, 250 kPa).

Afin de mieux visualiser la croissance invasive dans le PDMS au cours de ces différentes étapes, des cellules avec la membrane plasmique marquée par le fluorophore GFP (Vauchelles et al., 2010) ont été suivies sous microscope confocal à disque rotatif. La Figure 4.3B et C montre une acquisition en temps réel typique dans laquelle l'analyse du contour de la cellule n'a pas révélé de changement substantiel de la forme de la pointe du filament pendant la croissance invasive et la pénétration dans le puits suivant (Figure 4.3C et D, Figure 4.4A et B). En effet, le rayon de courbure de l'apex de la cellule était identique à celui des cellules en croissance en surface et il n'y avait aucun changement lors de l'évasion du PDMS. Le flambage du filament était évident lors de la croissance invasive pendant 35 à 45 min avant l'apparition d'un septum, paroi transversale délimitant les différentes cellules, c'est-à-dire les sites de division cellulaire (exemple de ces occurrences dans deux cellules, Figure 4.5A). Les analyses de l'angle du filament auquel le septum s'est formé indiquent que pendant la croissance invasive, la cytokinèse se produit la majorité du temps après le flambage du filament (Figure 4.5B).

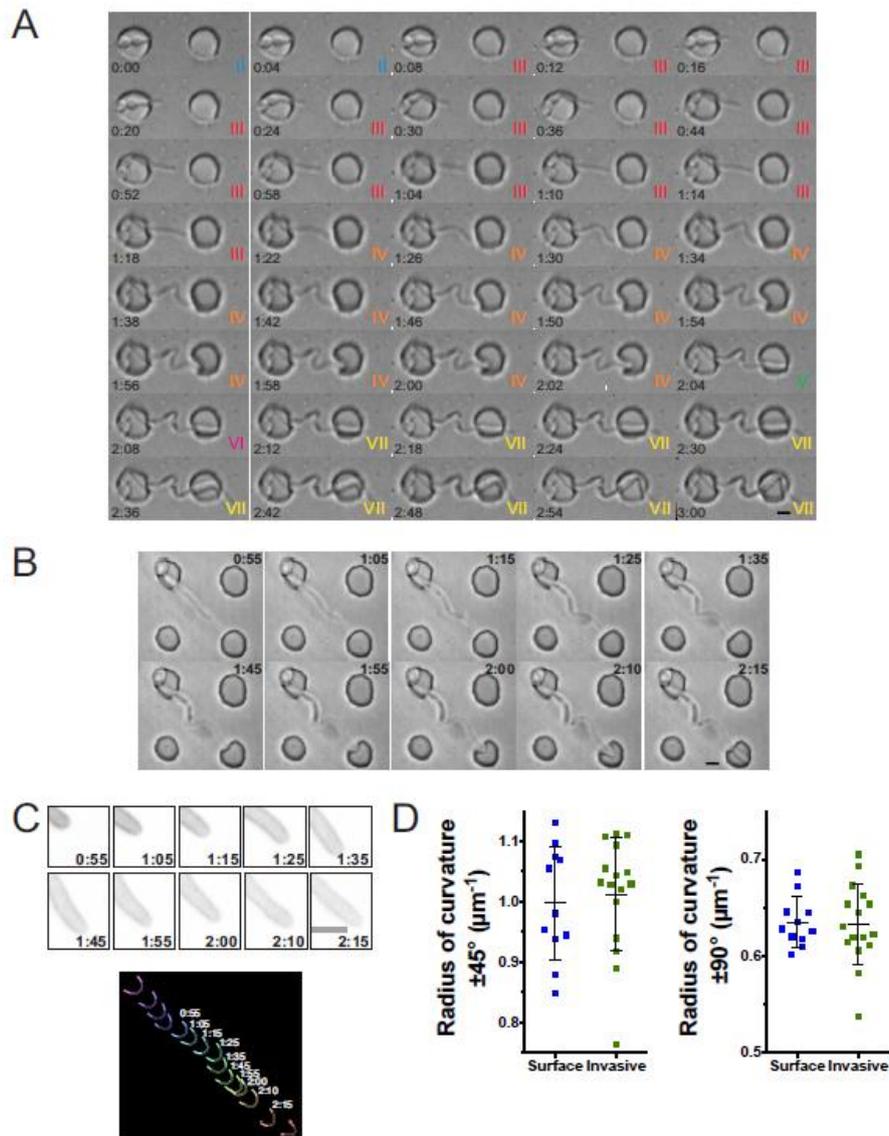


Figure 4.3 La forme de l'apex du filament n'est pas sensiblement altérée lors de la croissance invasive et de la sortie du PDMS.

A) Flambage et libération du filament lors d'une croissance invasive. Expérience de suivi en temps réel dans du PDMS 40: 1 (module de Young ~ 100 kPa) avec images DIC acquises toutes les 2 min. B-C) La forme de l'extrémité du filament ne change pas sensiblement pendant la sortie du PDMS. B) Expérience typique de suivi en temps réel dans du PDMS 40: 1 (module de Young ~ 100 kPa) avec des images DIC toutes les 5 min. C) Images des sommes des projections de $13 \times 0,5 \mu\text{m}$ z-sections des intensités de fluorescence de GFP-CtRac1 3.4B (en haut), courbure de la pointe (en bas) aux temps indiqués sur l'arc de $\pm 45^\circ$ indiquée par des lignes ouvertes et de $\pm 90^\circ$ indiqué par des lignes remplies. D) Les rayons de courbure de l'apex des cellules invasives et en croissance sur la surface sont indiscernables les uns des autres. Le rayon de courbure est la moyenne de 60 à 120 points de temps ($n = 11-16$ cellules) issus de 3-4 expériences indépendantes de croissance en surface (PDMS 40:1; module de Young ~ 100 kPa) et de croissance invasive (PDMS 35: 1 - 40: 1; module de Young 150-100 kPa). Les barres indiquent l'écart-type. (C. Puerner)

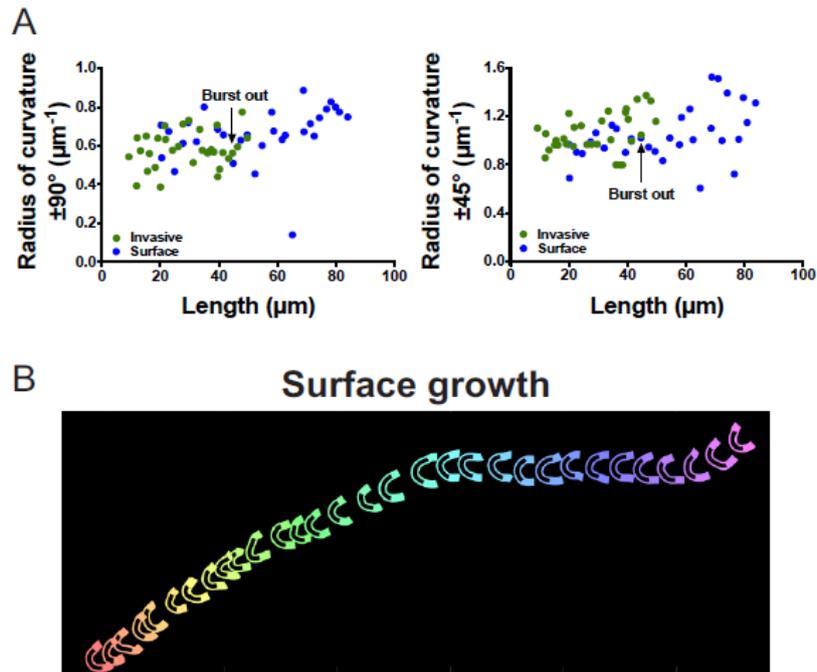


Figure 4.4 La forme de la pointe du filament n'est pas sensiblement modifiée pendant la croissance invasive dans le PDMS.

A) Le rayon de courbure de la pointe de l'hyphe est constant dans les cellules en croissance en surface et invasives. Rayon de courbure sur un arc de $\pm 90^\circ$ ou $\pm 45^\circ$ à l'extrémité du filament. B) Forme de l'extrémité de l'hyphe des cellules en croissance en surface au fil du temps. Les cellules ont été cultivées sur PDMS (30: 1; 250 kPa) et les sommes des projections d'intensité de GFP ont été analysées. Chaque couleur correspond à un temps (31 x 5 min). Les rayons de courbure avec $\pm 45^\circ$ sont indiqués par des lignes ouvertes et $\pm 90^\circ$ par des lignes pleines. (C. Puerner)

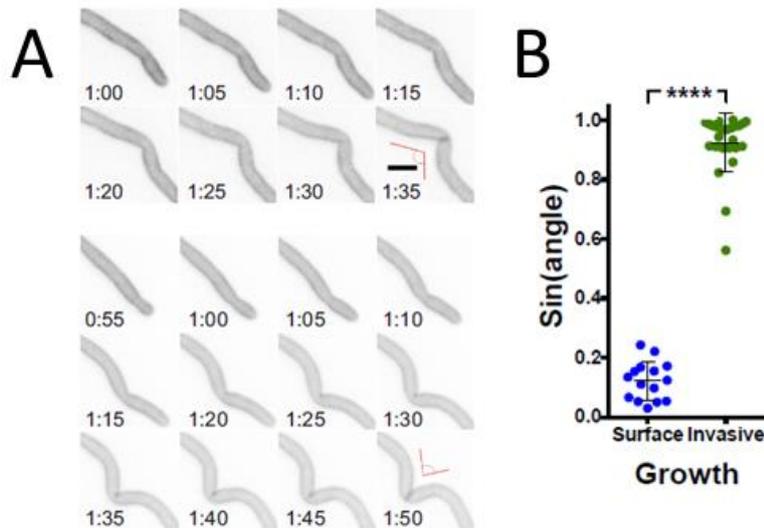


Figure 4.5 La division cellulaire se produit au site de flambage du filament pendant la croissance invasive.

A) Exemples (panneaux supérieur et inférieur) d'images aux temps indiqués (sommées des projections de signal GFP) pendant la croissance invasive dans le PDMS 40:1, lignes rouges indiquent l'angle de flambage. B) Le site de division cellulaire se produit là où le filament s'est déformé. Les cellules ont été suivies en croissance invasive dans le PDMS (40:1; module de Young ~ 100 kPa) ou en surface (30: 1 - 40: 1; module de Young 250-100 kPa), $n = 26$ et 15 , respectivement. Les sommes des projections du signal GFP ont été analysées en temps réel à partir de 5 expériences indépendantes ainsi que les Sinus des angles lorsque les septums sont formés. La formation des septums a été observée en moyenne 47 ± 20 min après le flambage. Les barres indiquent l'écart-type avec $p < 0,0001$. (C. Puerner)

La Figure 4.6 montre un exemple d'une courbe d'indentation obtenue au chapitre précédent dans les expériences macroscopiques de perforation du PDMS par une tige métallique. Il s'agit de la force appliquée sur la tige en fonction de son déplacement, je fais figurer les étapes correspondantes pour l'invasion d'un filament de *C. albicans*. La phase initiale de force croissante correspond à la compression élastique du PDMS ($F_{\text{elast compr}}$; analogue au stade de croissance II, Figure 4.3A), atteignant la force nécessaire pour casser la surface du PDMS, F_{crit} . La phase suivante correspond à l'extension dans le PDMS, analogue à la croissance invasive, F_{invas} (analogue au stade de croissance III, Figure 4.3A) aboutissant à la sortie du PDMS (F_{exiting} ; analogue au stade de croissance IV, Figure 4.3A). La phase finale correspond au moment où l'extrémité de la sonde a émergé du PDMS (F_{out} ; analogue au stade de croissance V, Figure 4.3A).

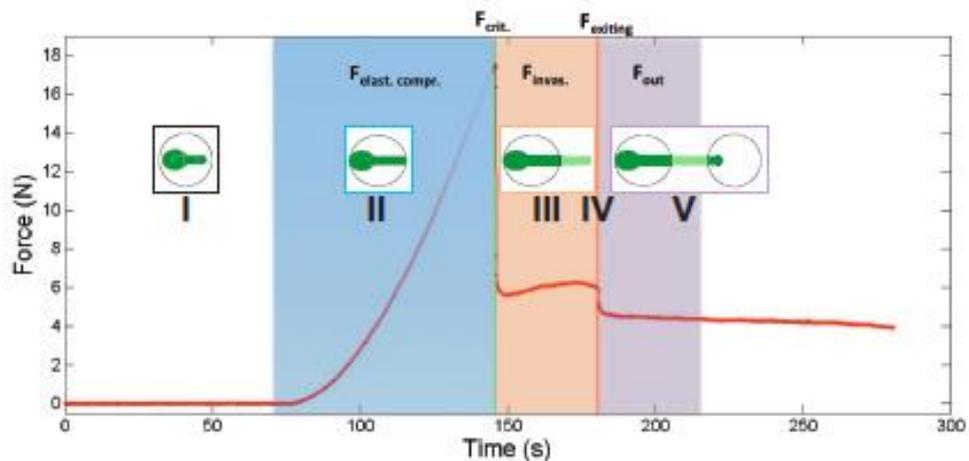


Figure 4.6 Forces dans le modèle de croissance invasive dans le PDMS.

Evolution de la force lors d'une indentation dans du PDMS. Un échantillon cylindrique de PDMS 10 :1 (module de Young ~ 2 MPa) a été indenté par une sonde en acier de 1 mm de diamètre. La vitesse de déplacement de la sonde était de $63 \mu\text{m/s}$ et la force a été déterminée au cours des différentes étapes, comme indiqué, c'est-à-dire la compression, la pénétration et après la sortie de l'extrémité de la sonde du PDMS. Stade analogue de la croissance invasive du filament de *C. albicans* schématisé dans les encarts.

Les filaments sont capables de pénétrer dans le PDMS de ratio 35:1, pour lequel F_{crit} est de ~ 7 N avec une sonde de 1 mm de diamètre. Sachant que la matière viscoélastique, PDMS, a un comportement purement élastique à l'échelle de la croissance de *C. albicans* (chapitre 3), la mise à l'échelle linéaire peut être effectuée. La mise à l'échelle au diamètre d'un filament d'hyphes a été effectuée en supposant une contrainte critique constante, étant donné que le diamètre du filament est de plusieurs ordres de grandeur supérieur à la taille de maillage PDMS, et a été calculée en prenant le rapport sonde métallique / rayon du filament au carré. En ramenant la force mesurée pour une sonde de 1mm de diamètre au diamètre d'un filament hyphal, la force d'environ $31 \mu\text{N}$ est obtenue, indiquant que les hyphes génèrent des forces supérieures à $31 \mu\text{N}$ pour pénétrer dans le PDMS. De plus, nos résultats indiquent qu'à une rigidité de 200 kPa, pour laquelle une faible pénétration de PDMS est observée (Figure 4.2B et D), le F_{crit} est de ~ 8 N avec une sonde de 1 mm de diamètre, soit $\sim 35 \mu\text{N}$ lorsque mis à l'échelle d'un filament hyphal, qui correspondrait à la force maximale qu'il puisse développer.

La force résistive affecte l'extension et la morphologie des hyphes

Le flambage des filaments, ainsi que la déformation des puits de PDMS lors de la croissance invasive, ont indiqué que ces filaments répondaient à une force résistive. Celle-ci a été quantifiée grâce à notre modèle physique qui porte lui sur le fait qu'en plus, les filaments provoquaient la rupture du PDMS et sa perforation.

Taux d'invasion. Le pourcentage de cellules qui pénètrent dans le PDMS dépend du module de Young (Figure 4.2D et F) et les analyses du pourcentage d'invasion de PDMS à deux valeurs de rigidité indiquent que le seuil d'invasion est compris entre 120 kPa et 200 kPa (Figure 4.7A). Ce qui correspond à des ratio entre 30:1 et 40:1.

Taux d'extension en fonction du temps. Pour étudier les effets de la force résistive sur la croissance filamenteuse, la longueur des filaments en fonction du temps, pour des cellules qui poussent sur et dans le PDMS, a été déterminée.

Comparaison surface/invasion. La Figure 4.7C montre que la vitesse d'extension des filaments est constante, et réduite d'environ 30% dans le PDMS de rigidité ~ 100 kPa ($0,19 \pm 0,05 \mu\text{m} / \text{min}$ ($n = 32$)), comparée à la croissance de surface ($0,28 \pm 0,07 \mu\text{m} / \text{min}$ ($n = 29$)) (Figure 4.7C). Cette vitesse d'extension des filaments est encore réduite ($0,15 \pm 0,08 \mu\text{m} / \text{min}$ ($n = 23$)) lors de la croissance dans du PDMS de rigidité ~ 150 kPa (Figure 4.7C). Pour confirmer que les réductions des vitesses d'extension pendant la croissance invasive n'étaient pas dues à des changements substantiels dans la position z de l'apex du filament en croissance, les cellules ont été cultivées dans des puits de PDMS marqués avec de la concanavaleine A et des images de chaque plan z ont été projetées sur le Plan XZ (Figure 4.7D). Ces projections montrent que les filaments poussent légèrement vers le bas dans le PDMS, sous le fond du puits, avec un déplacement maximal de $5 \mu\text{m}$ dans l'axe z pour un filament de $25 \mu\text{m}$, ce qui entraînerait au plus une réduction de 2% de la vitesse d'extension. En revanche, la Figure 4.8A montre que la vitesse moyenne d'extension du filament des cellules en croissance sur la surface ne dépend pas de la rigidité du substrat, avec des vitesses très semblables sur du PDMS, quelle que soit la rigidité, entre 100 et 200 kPa. Par contre, la vitesse d'extension en croissance invasive normalisée par celle de la croissance en surface pour chaque expérience est corrélée avec la rigidité du substrat (Figure 4.8B). L'extrapolation de l'ordonnée à l'origine, pour laquelle la vitesse d'extension du filament en croissance invasive est égale à celle du filament en croissance en surface, indique une rigidité du substrat d'environ 20 kPa. Ce qui suggère que pendant la croissance filamenteuse en surface, les cellules subissent une force résistive équivalente à celle qui serait subie dans un substrat extrapolé de manière simple à 20 kPa. On peut supposer que ce sont les forces d'adhésion sur la surface qui provoque cette légère force résistive. La vitesse d'extension du filament de cellules en croissance sur la surface du PDMS était légèrement réduite par rapport à celle de cellules en croissance dans un milieu liquide ($0,26 \pm 0,09 \mu\text{m} / \text{min}$ par rapport à $0,32 \pm 0,01 \mu\text{m} / \text{min}$; $p = 0,001$) (Figure 4.8). Il convient de noter que très peu de cellules ont envahi le PDMS à 200 kPa, en moyenne $\sim 5\%$ (Figure 4.7A), mais, de manière frappante, la vitesse d'extension de ces filaments paraît similaire à celle observée pour des cellules en croissance sur du PDMS moins rigide, suggérant que ces cellules (qui seraient particulières) pourraient jouer un rôle critique dans l'invasion tissulaire.

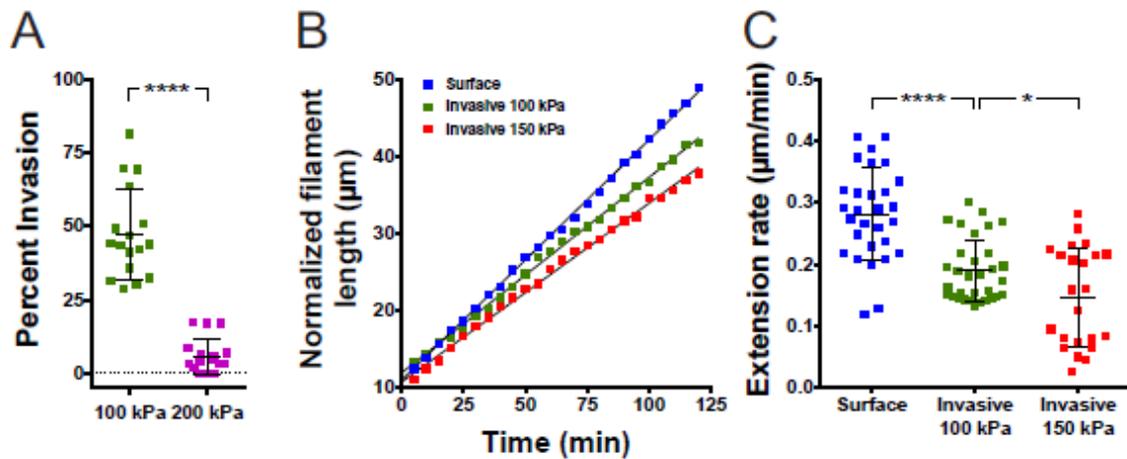
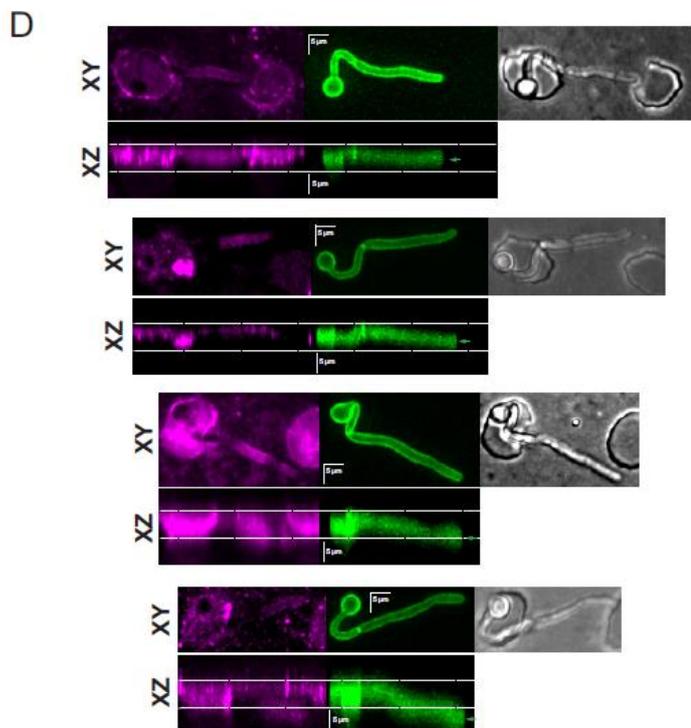


Figure 4.7 La vitesse d'extension du filament est réduite pendant la croissance invasive.

A) Limite de rigidité du substrat PDMS pour la pénétration du filament. Le pourcentage de cellules invasives provenant d'expériences de microscopie en temps réel à large champ (4 expériences indépendantes pour chaque rigidité de PDMS, module de Young indiqué, 40:1 et 30:1) a été quantifié ($n = 50-60$ cellules par détermination sur un total de 900-1200 cellules). Les barres indiquent l'écart-type et **** est $p < 0,0001$. B) L'extension du filament en fonction du temps est linéaire pendant la croissance en surface et invasive. Cellules cultivées sur ou dans du PDMS à la rigidité indiquée (35: 1 et 40: 1) pendant 2 heures, avec des images



toutes les 5 min. La longueur du filament a été déterminée en utilisant la somme des projections des images GFP et normalisée afin que la longueur initiale soit 10 à 12 µm. C) La vitesse d'extension du filament est réduite pendant la croissance invasive. La vitesse d'extension a été déterminée à partir du suivi en temps réel de cellules en croissance dans du PDMS de rigidité indiquée (35:1 et 40:1). La croissance en surface a été suivie sur du PDMS de rigidité 85-190 kPa (30:1 - 40:1). Quantification de 2-4 expériences indépendantes, $n = 20-30$ cellules par rigidité de PDMS. Les barres indiquent l'écart-type avec **** $p < 0,0001$ et * $p < 0,05$. D) Les filaments invasifs ne subissent pas de changements substantiels. Les cellules exprimant la GFP à la membrane plasmique ont été imagées (vert ; panneau du milieu) après croissance dans des puits de PDMS 200 kPa (30:1) marqués avec Alexa-633 ConA (magenta; panneau de gauche) ; images en DIC (panneau de droite). Les projections maximales XY (panneaux supérieurs) et XZ sont représentées par des lignes pointillées indiquant les limites supérieure et inférieure du puits et la flèche verte indiquant le centre dans l'axe z de la pointe du filament. (C. Puerner)

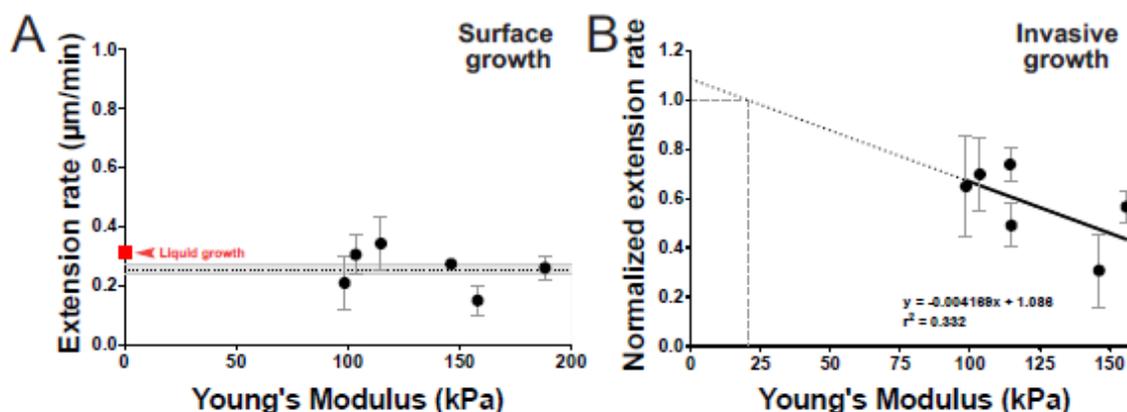


Figure 4.8 La vitesse d'extension du filament des cellules en croissance sur du PDMS est légèrement réduite par rapport à celle des cellules en croissance en milieu liquide.

A) La vitesse d'extension du filament sur la surface du PDMS est indépendante de la rigidité et réduite par rapport à celle ces cellules en milieu liquide. La vitesse d'extension a été mesurée comme pour la figure 7C. Les longueurs de filament des cellules en milieu liquide ($n = 75-80$ cellules) ont été mesurés toutes les 30 minutes avec la moyenne et la SEM montrées en rouge. Vitesses d'extension des cellules en surface déterminées comme pour la figure 7C ($n = 30$ cellules ; 3-9 expériences par rigidité PDMS). Les barres indiquent SD. La moyenne des vitesses d'extension des filaments en surface (ligne noire en pointillé) et SEM (zone grise) est indiquée. B) Vitesses d'extension des filaments lors de la croissance invasive déterminées comme pour la figure 7C ($n = 53$ cellules ; 5 à 10 expériences par rigidité PDMS) et normalisées aux vitesses d'extension en surface, avec des barres indiquant la SD. (C. Puerner)

Transition à la sortie du PDMS. En plus de la comparaison des cellules en croissance dans le PDMS et à la surface, les cellules en transition entre ces deux modes ont été examinées. La Figure 4.10B et C montre un exemple d'une telle transition, dans laquelle la vitesse d'extension est réduite pendant la croissance invasive et augmente en sortant du PDMS. Les mesures des diamètres du filament juste avant et après la sortie du PDMS, ont révélé que le diamètre est réduit à la sortie du PDMS ($2,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ par rapport à $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Figure 4.10D).

Croissance en surface, à l'intérieur des puits. La réduction de la vitesse d'extension du filament en réponse à une force résistive suggère que des effets similaires pourraient être observés pour les cellules subissant une flexion subapicale dramatique dans des puits de PDMS rigide (Figure 4.11Figure 4.9A). La Figure 4.11B montre que, dans de telles conditions, il y a effectivement une réduction de la vitesse d'extension du filament qui est en moyenne de $0,10 \pm 0,01 \mu\text{m} / \text{min}$ (sur 100-150 min). Les vitesses d'extension des filaments des cellules en surface sont constantes au fil du temps, tandis que celles des cellules subissant une flexion subapicale dramatique diminuent en même temps que le filament hyphal remplit le puits (Figure 4.11C) ; les vitesses d'extension initiales des filaments étaient réduites de 3 fois par rapport à celles observées pour les cellules en surface et réduites encore 3 fois après 2 heures de croissance. En raison des géométries complexes pendant un tel mode de croissance, la

force résistive que le filament subit pendant qu'il remplit la chambre n'a pas pu être déterminée, mais la vitesse d'extension initiale est similaire à celle des filaments en croissance invasive dans du PDMS à 150 kPa. Plus le filament s'allonge, tout en restant coincé dans un puits, plus la force résistive augmente. Tout se passe comme si par empêchement stérique, la pression globale doit augmenter dans le puits et c'est le filament lui-même qui est à la source d'une augmentation de la pression qui finit par réduire sa croissance.

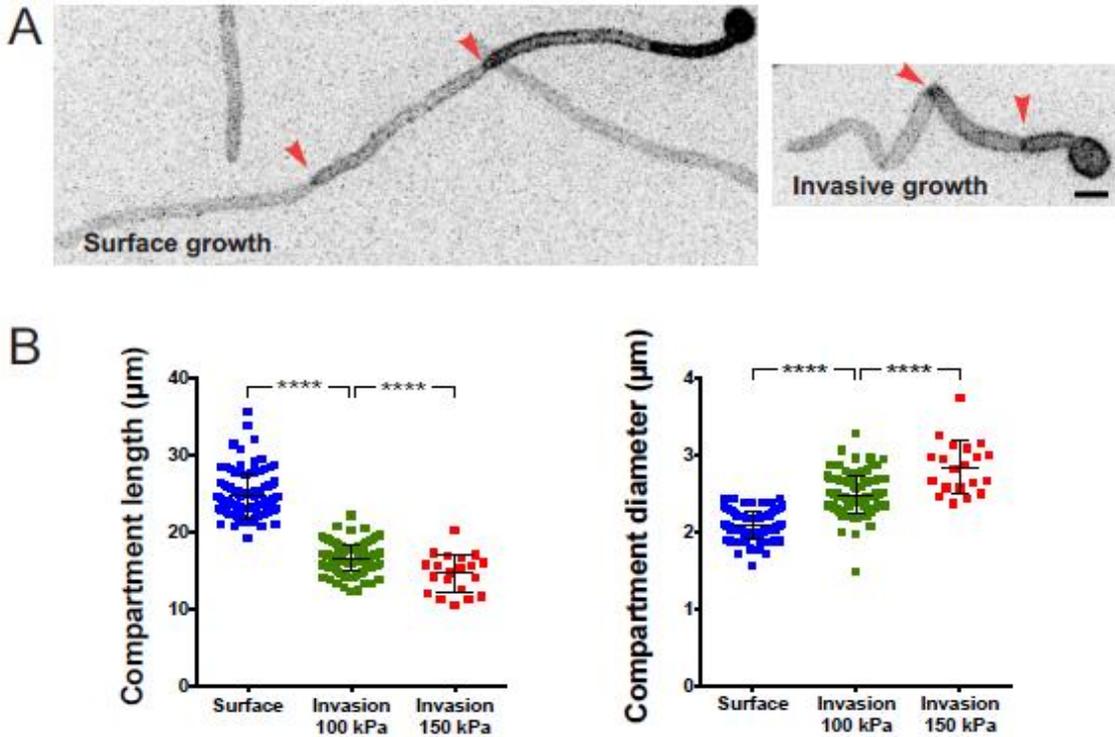


Figure 4.9 La morphologie du filament est modifiée lors de la croissance invasive.

A) Somme des projections des images de cellules exprimant GFP-CtRac1 cultivées en présence de sérum, sur ou dans du PDMS de rigidité 115 kPa, pendant 3h15 ou 2h15, respectivement. Les flèches indiquent les septums et le compartiment se trouve entre les flèches. B) La longueur du compartiment est réduite et le diamètre est augmenté lorsque les cellules sont cultivées dans un substrat plus rigide (35:1 et 40:1). La longueur entre deux septums a été mesurée sur $n = 20-115$ cellules ; 2 à 22 expériences (panneau de gauche) et le diamètre du filament a été mesuré dans $n = 20-115$ cellules ; 2-22 expériences (panneau de droite). La barre d'erreur est l'écart-type et $p < 0,0001$.

Morphologie des hyphes sous contraintes. La différence de vitesse d'extension du filament pourrait être soit due à une réduction globale de la croissance cellulaire, soit à une réduction de la croissance apicale polarisée. Pour différencier ces possibilités, la longueur et le diamètre des compartiments (entre 2 septums) pour les cellules qui poussent en surface et dans le PDMS (100 kPa) ont été mesurés. La Figure 4.9B montre que la longueur du compartiment diminue d'environ 30% ($24,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$, $n = 100$) pour les cellules en surface comparées aux cellules invasives ($16,6 \pm 1,8 \mu\text{m}$, $n = 120$) et le diamètre du filament augmente simultanément (respectivement de $2,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ à $2,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$). En conséquence, le volume du compartiment reste constant ($83 \pm 17 \mu\text{m}^3$ pour les cellules en surface comparé à $80 \pm 18 \mu\text{m}^3$ pour les cellules invasives), ce qui indique que la croissance cellulaire globale n'est pas altérée, mais plutôt la croissance polarisée. Les analyses des cellules filamenteuses en croissance dans un PDMS plus rigide (150 kPa) ont montré une diminution supplémentaire de la longueur du compartiment ($14,6 \pm 2,5 \mu\text{m}$) corrélée à une augmentation du diamètre ($2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Cette altération de la morphologie dépend de la croissance contre une force résistive dans le PDMS car le diamètre de la partie du filament en dehors du PDMS est similaire à celui des cellules en surface (Figure 4.10Figure 4.11A).

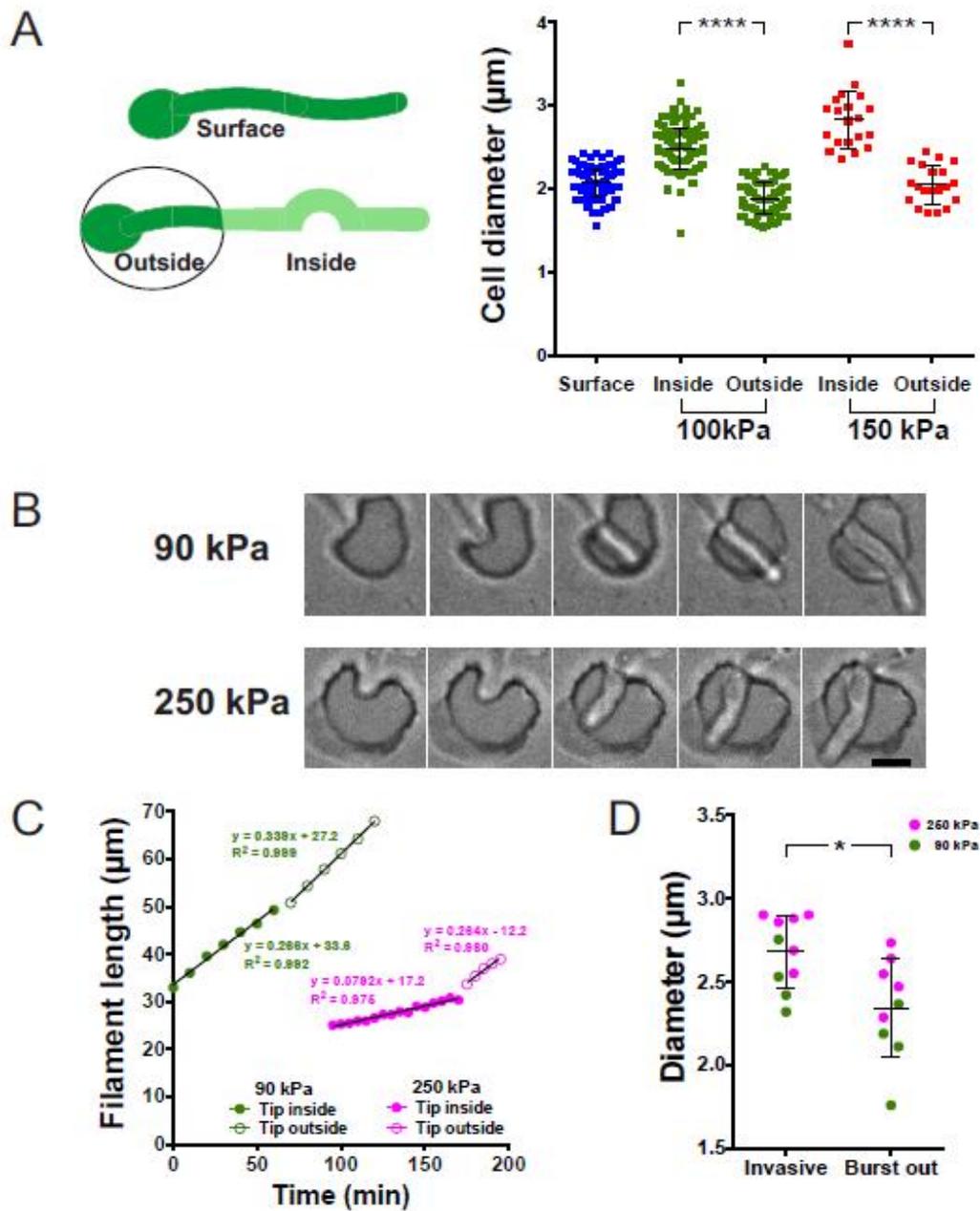


Figure 4.10 Le diamètre du filament augmente pendant la croissance invasive et diminue après la sortie du PDMS.

A) Diamètre du filament à l'intérieur et à l'extérieur du PDMS à deux rigidités. Le diamètre du filament a été mesuré comme pour les figures 3.11. Les barres indiquent l'écart-type, avec $p < 0,0001$ entre l'intérieur et l'extérieur pour chaque rigidité PDMS (40: 1 et 35: 1). B) Images de filaments sortant du PDMS. Images en DIC prises toutes les 5 min (~ 250 kPa; 30: 1) ou 10 min (90 kPa; 40: 1). C) La vitesse d'extension du filament augmente à la sortie du PDMS. La longueur du filament a été mesurée à partir d'images de somme des projections du signal de GFP avant (symboles remplis de vert et magenta) et après la sortie de PDMS (symboles ouverts vert et magenta). D) Le diamètre du filament est réduit à la sortie du PDMS. Le diamètre a été mesuré avant et après la sortie du PDMS, 4 à 5 fois. Les barres indiquent l'écart-type et *, $p = 0,01$. (C. Puerner)

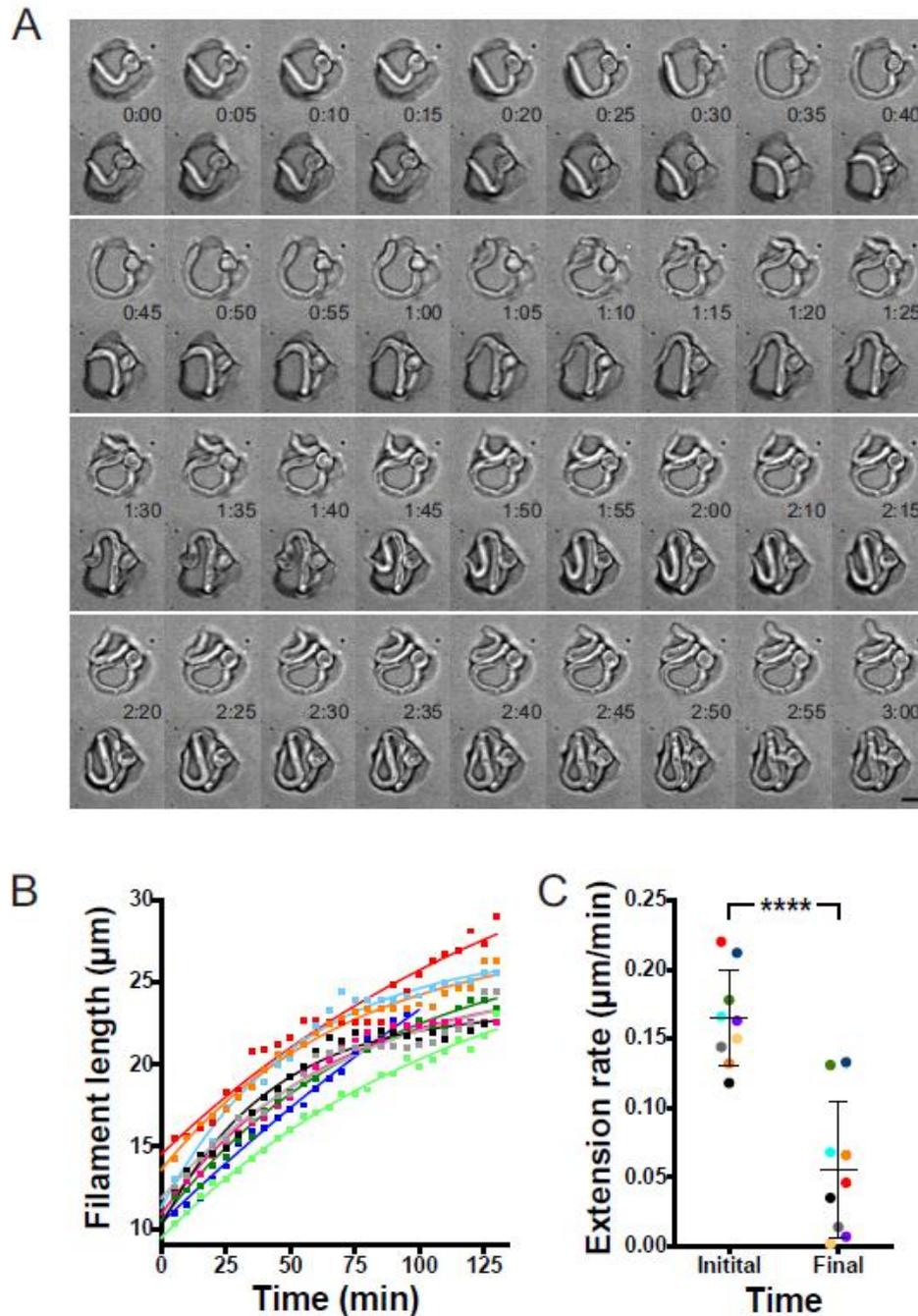


Figure 4.11 Les cellules confinées dans les puits de PDMS rigides ont des vitesses d'extension de filament réduites.

A) Croissance confinée dans un puits de PDMS. Expérience type de microscopie en temps réel utilisant du PDMS à 160 kPa, avec des images DIC toutes les 5 min. B) La vitesse d'extension du filament dans une chambre rigide n'est pas linéaire. La longueur du filament a été mesurée à partir d'images toutes les 5 min pendant ~ 2 h et la somme des projections d'images en GFP ($n = 9$ cellules). C) La vitesse d'extension du filament est réduite à mesure que la chambre se remplit. Les vitesses d'extension initiale (longueur de filament 10-20 μm) et finale (longueur de filament > 20 μm) ont été mesurées à partir des sommes des projections. (Les couleurs représentent des cellules individuelles). Les barres indiquent écart-type et **** $p < 0,0001$. (C. Puerner)

Nos résultats indiquent que des effets sur la morphologie cellulaire sont observés sur les filaments des cellules en croissance dans le PDMS, ce qui suggère que les forces résistives du PDMS conduisent à cette altération de la morphologie. Les modules de Young pour les cellules hôtes de mammifères sont compris entre 1 et 100 kPa. Par conséquent, les effets observés sur la vitesse d'extension du filament et la morphologie sont susceptibles d'être pertinents pour la pénétration active des cellules épithéliales, et il est intéressant de supposer que la pression de turgescence, en particulier les osmolytes critiques pour générer cette force, pourrait être une cible pour des traitements antifongiques.

4.1.3. Pression de turgescence

Nous avons vu que la croissance dans un milieu résistif se produit à un rythme plus lent. On interprète cela par le fait que la cellule « utilise » une partie de sa turgescence pour surmonter la force résistive appliquée par l'environnement. Comme décrit précédemment les hyphes de *C. albicans* sont capables de pénétrer dans le PDMS. Une fois que les cellules sont dans le matériau, la vitesse d'extension du filament hyphal est réduite et le rapport entre vitesse d'extension à l'intérieur et sur le matériau dépend également de r (Figure 4.6A). Pouvons-nous déduire la quantité de force que ces cellules exercent à partir de ces données ?

La quantité exacte de force produite par un filament en croissance dépend du comportement mécanique de la paroi cellulaire. D'après le modèle (discuté dans le chapitre 1), proposant que la croissance hyphale est un phénomène viscoplastique, la vitesse de croissance $v_0 = dL/dt$ est proportionnelle à la contrainte dépassant un seuil P_c , correspondant à la contrainte critique pour que la paroi commence à se déformer (Minc et al., 2009) :

$$v_0 \propto \frac{P - P_c}{Y} \quad (4.1)$$

Où Y est le module élastique de la paroi cellulaire et $\Delta P = P - P_c$ est la pression de turgescence effective qui est la différence entre la pression totale de turgescence P et la contrainte critique P_c . Lorsque le filament se développe dans un matériau, la pression de turgescence effective est réduite par la force externe, ce qui réduira le taux de croissance. Un simple équilibre des forces dans le sens de la croissance donne :

$$\frac{v(F)}{v_0} = \left(1 - \frac{F_{in}}{S(P - P_c)}\right) \quad (4.2)$$

Ce qui revient à l'équation $v(F) = v_0 \left(1 - \frac{F}{\pi R^2 \Delta P}\right)$ (1.22) présentée dans le chapitre 1, où $S = \pi R^2$ est la section transversale du filament se développant librement sur la surface et F_{in} est la force externe appliquée par le PDMS, qui oppose une résistance à la croissance. Cette relation suppose que la pression de turgescence effective ne varie pas de manière significative entre les conditions de déplacement libre et contrainte.

Dans nos expériences, il apparaît que les filaments invasifs du PDMS grossissent progressivement et ralentissent. Pour tenir compte de l'augmentation de la force exercée par

un filament ayant un diamètre plus large, la variation de la surface est incluse dans le bilan de force modifié :

$$\frac{v(F)}{v_0} = \frac{S_r}{S} - \frac{F_{in}}{S(P - P_c)} \quad (4.3)$$

Où S_r est la section transversale du filament dans le matériau, v_0 est la vitesse de croissance des cellules sur la surface de PDMS ; $v(F)$ est la vitesse de croissance des cellules dans l'échantillon PDMS.

Afin d'estimer la force résistive rencontrée par un filament lors de sa croissance dans du PDMS, j'ai effectué une série d'expériences avec des sondes macroscopiques, comme on l'a vu au chapitre précédent. Une sonde en acier qui imite la forme du filament, dont le rayon de courbure de la pointe se rapprochait de la forme de la pointe du filament, avançant continuellement jusqu'à et dans un cylindre de PDMS (configuration $x_{max}=L$) de rigidité différente. Une fois la rupture du PDMS se produit, la force exercée sur la sonde chute drastiquement. Elle ne revient cependant pas complètement à zéro mais à une valeur F_{invas} , car la sonde doit combattre la force de rappel élastique du PDMS, l'adhésion et la friction. Une fois la sonde sortie du matériau, il reste une force résiduelle correspondant uniquement au frottement et à l'adhésion F_{out} . Les filaments de *C. albicans* ne poussent qu'à leur extrémité, par conséquent la partie du filament qui glisse et adhère potentiellement au PDMS est minimale. Afin d'éliminer ces contributions, la différence entre F_{invas} et F_{out} est calculée (Tableau 4.1). La force résistive appliquée par le PDMS sur le filament est déduite en supposant que la force évolue linéairement en fonction de la surface de la section transversale de l'objet pénétrant. Il faut noter que cette hypothèse est correcte lorsque le filament combat une force de rappel purement élastique, ce qui a été vérifié par DMA, qui montre qu'aux faibles déformations l'écart entre le module d'Young et sa partie élastique est très faible. On peut affirmer aisément qu'à l'échelle de *C. albicans* le PDMS se comporte comme un matériau purement élastique, d'autant plus que l'on sait que la vitesse de déformation induit par *C. albicans* est 300 fois plus faible, que celle appliqué par viscoanalyseur et que plus la déformation est faible plus E/E' se rapproche de 1. L'hypothèse (la force évolue linéairement en fonction de la surface de la section transversale) peut s'effondrer également si le matériau oblige le filament à exercer une force continue pour ouvrir la fissure, c'est-à-dire si la fissure ne se propage pas en avant de la pointe (Fakhouri et al., 2015 ; Persson et al., 2005). Mais notre observation pour le PDMS 40:1 que le front de fissure se propagent à 100-160 $\mu\text{m/s}$, nous permet de supposer que le front de fissure lors de l'invasion de *C. albicans* se propagent plus rapidement que l'extension de l'hyphe qui est moins de 0,3 $\mu\text{m/min}$ dans le PDMS. Etant donné que pendant l'invasion de *C. albicans* dans le PDMS, nous n'observons pas une déformation du PDMS, comme dans la condition $r_{max}=R$, j'ai gardé les valeurs des forces, issues des mesures sur les cylindres de PDMS dans la condition $x_{max}=L$.

F_{in} est ramenée à l'échelle microscopique (hyphe à l'intérieur du PDMS) :

$$F_{in} = (F_{invas} - F_{out}) \frac{S}{S_{sonde}} \quad (4.4)$$

En injectant les valeurs expérimentales dans équation $\frac{v(F)}{v_0} = \frac{S_r}{S} - \frac{F_{in}}{S(P-P_c)}$ (4.3), des valeurs de pression de turgescence effective de l'ordre de MPa sont obtenues, voir Tableau 4.2. Bien que la contrainte critique P_c ne soit pas connue, elle est forcément positive, car la pression de turgescence totale doit être strictement supérieure à la pression de turgescence effective.

PDMS	R (mm)	S_{sonde} (mm ²)	$F_{invas} - F_{out}$ (N)
35 :1	0.5	0.79	1.5 ± 0.7
40 :1			0.7 ± 0.3

Tableau 4.1 Données expérimentales d'indentation

De gauche à droite : Ratio de PDMS, R rayon de la sonde, S_{sonde} surface transversale de la pointe, la composante d'élasticité de la force ressentie par la sonde dans le PDMS.

PDMS	r (μm)	S (μm ²)	F_{in} (μN)	$P - P_c$
35 :1	1.04	3.40	6 ± 3 μN	6 ± 3 MPa
40 :1			3.2 ± 1.4 μN	2 ± 1 MPa

Tableau 4.2 Calcul de la pression de turgescence

De gauche à droite : Ratio de PDMS, r rayon du filament à la surface de PDMS, S surface transversale de l'hyphe, la force ressentie par l'hyphe dans le PDMS $F_{in} = (F_{invas} - F_{out}) \frac{S}{S_{sonde}}$, ΔP pression de turgescence $\Delta P = F_{in} / [S(1 - v_r / v_0)]$.

PDMS	r^* (μm)	S_r (μm ²)	F_{in}^* (μN)	$(P - P_c)^*$
35 :1	1.42	6.33	12	3.1 ± 1.5
40 :1	1.24	4.83	4.30	1.5 ± 0.7

Tableau 4.3 Calcul de la pression de turgescence en prenant en considération le changement de diamètre hyphale

De gauche à droite : Ratio de PDMS, r^* rayon de filaments se développant dans PDMS, S_r^* surface transversale de l'hyphe, la force ressentie par l'hyphe dans le PDMS $F_{in}^* = (F_{invas} - F_{out}) \frac{S_r}{S_{sonde}}$, ΔP pression de turgescence $\Delta P^* = F_{in}^* / [S(S_r / S - v_r / v_0)]$. Les erreurs sur les mesures expérimentales sont des écarts types des mesures répétées.

En tenant compte du fait que les filaments ont un diamètre plus élevé lorsqu'ils se développent dans le PDMS, une valeur légèrement inférieure de pression de turgescence effective est obtenue (Tableau 4.3). Cette valeur de la pression de turgescence se situe dans la plage rapportée à la fois pour les cellules planctoniques et biofilm de *C. albicans*, ~ 1,2 MPa (Thomson et al., 2015) et 2 MPa (Desai et al., 2015), respectivement, ainsi que pour *S. pombe*, 0,85 - 1,5 MPa (Atilgan et al., 2015).

Néanmoins, il faut noter que ces valeurs sont une pression de turgescence effective. En d'autres termes, ΔP est la pression de turgescence dépassant la contrainte critique nécessaire pour déformer la paroi cellulaire (Minc et al., 2009). Par conséquent, une combinaison d'altération de la pression de turgescence du compartiment local, de différence de déformabilité de la paroi cellulaire ou d'ajustements potentiellement plus fins dans la géométrie de la pointe peut jouer un rôle important dans la pénétration et l'invasion.

Le modèle expérimental physique, cependant, ne prend pas en compte la géométrie de la pointe de l'hyphe, qui est susceptible d'avoir un rayon de courbure plus élevé que la sonde métallique, ce qui entraînerait une surestimation des forces dans le modèle physique. Des mesures des forces relatives aux hyphes nécessiteront une description plus précise de la taille et de la géométrie de la pointe des hyphes. Une possibilité est que, lors de la croissance dans le PDMS plus rigide, il y ait une augmentation de la pression de turgescence ; nos résultats sont cohérents avec un scénario tel que ΔP passe de 1,5 MPa à 3,1 MPa, avec une augmentation de la rigidité du PDMS de 100 kPa à 150 kPa. Cette augmentation de la pression de turgescence pourrait être responsable de l'augmentation du volume de compartiments cellulaires invasifs dans 150 kPa PDMS ($92 \mu\text{m}^3$ contre $83 \mu\text{m}^3$ pour les cellules à croissance en surface, $p = 0,045$).

On adapte la formule de l'expansion de la paroi cellulaire $\frac{Y_{lateral}}{\Delta P} = \frac{R_1}{h_{lateral}R_1^*}$ (1.7) (Atilgan et al., 2015) à notre cadre de figure où R_1 et R_0 sont le rayon de la cellule dans le PDMS et de celui en surface, respectivement. En faisant une application numérique on obtient deux valeurs différentes du module d'Young de la paroi cellulaire, sachant que la paroi cellulaire est un organe très dynamique et que son élasticité et son épaisseur peuvent varier cet écart peut être facilement expliqué (par la barre d'erreur également (Tableau 4.4). En supposant que le module d'Young de la paroi cellulaire Y est constant à ces deux conditions de rigidité PDMS, $\frac{\Delta P}{Y}$ (35:1) est 1,7 fois supérieur à $\frac{\Delta P}{Y}$ (40: 1), ce qui est de même ordre que l'augmentation observée de la pression de turgescence effective ($\Delta P(35:1)$ est 2 fois supérieur à $\Delta P(40:1)$) obtenu par la différence de taux de croissance $v(F) = v_0 \left(1 - \frac{F}{\pi R^2 \Delta P}\right)$ (1.22).

PDMS	ΔP (MPa)	R_0 (μm)	R_1 (μm)	Y (MPa)	$\frac{R_1 R_0}{h(R_1 - R_0)}$
35 :1	3.1 ± 1.5	1.04 ± 0.2	1.42 ± 0.3	60.24 ± 10	19.43 ± 6
40 :1	1.5 ± 0.7		1.24 ± 0.2	48.36 ± 8	32.24 ± 4

Tableau 4.4 Calcul du module d'Young en considérant le changement de diamètre hyphale

Le taux d'extension légèrement réduit sur la surface du PDMS par rapport à celui dans le liquide, ainsi que l'extrapolation du taux d'extension normalisé en fonction de la rigidité PDMS à où $\frac{v(F)}{v_0} = 1$, indiquent que pendant la croissance sur une surface les hyphes subissent une petite force résistive, équivalente à la croissance dans un PDMS mou, moins rigide (~ 20 kPa), attribué à l'adhésion / frottement. Il est probable qu'en fonction de la surface cellulaire, la contribution de l'adhésion / frottement variera. Il faut noter que malgré la force résistive

estimée pendant la croissance invasive de 3-10 μN à l'échelle des hyphes, de changements dramatiques dans la forme de la pointe du filament n'ont pas été observés, on peut en déduire donc que l'adaptation de la géométrie de la pointe hyphale n'est pas une stratégie adoptée par *C. albicans* pour l'invasion.

Nous avons utilisé la micro-fabrication PDMS pour déterminer la relation entre la rigidité du substrat et la croissance des cellules filamenteuses de *C. albicans*. En dessous d'un seuil de rigidité d'environ 200 kPa, *C. albicans* peut pénétrer et croître dans le PDMS. L'état chimique inerte de ce polymère, ainsi que la déformation des puits observée, suggèrent que la pénétration active entraînée par la pression de turgescence est essentielle pour cette croissance invasive. La croissance filamenteuse de *C. albicans* dans un substrat rigide est caractérisée par un flambage spectaculaire du filament, qui est corrélé avec la position des sites de division cellulaire, et la vitesse d'extension du filament est inversement dépendante de la rigidité. La croissance invasive est associée à une altération de la morphologie, la longueur de compartiment cellulaire est réduite et le diamètre élargi. Nos résultats révèlent que les changements de morphologie ne sont pas dus au régulateur de polarité de cellule (Cdc42), mais plutôt à des forces mécaniques du substrat. Fait intéressant, même avec un PDMS plus rigide (~ 200 kPa), nous avons observé un petit pourcentage de cellules capables d'envahir le substrat, suggérant que ces cellules ont des propriétés spécifiques qui pourraient être un avantage lors de l'invasion des épithéliums.

4.2. Croissance contre une force résistive de cellules avec un défaut de composition en β -1,3-glucane

J'ai commencé à examiner l'effet de plusieurs perturbateurs génétiques et chimiques sur les paramètres de croissance de *C. albicans* dans les réseaux de micropuits en PDMS. Au départ, je me suis concentrée sur des conditions de perturbation de la paroi cellulaire, en particulier un mutant qui affecte l'intégrité de la paroi cellulaire et dans un deuxième temps un médicament antifongique Caspofungin (Caspof). Le mutant susceptible d'altérer la paroi cellulaire utilisé est *rho1*. La petite GTPase Rho1 est une sous-unité de la β -1,3 glucane synthase (Kondoh et al., 1997), critique pour la paroi cellulaire. *RHO1* est essentiel et nous avons utilisé un mutant hétérozygote *rho1*, où seule une copie du gène est exprimée, résultant en une altération de la paroi cellulaire, vraisemblablement *via* une réduction en β -1,3 glucane, sans altération de la croissance filamenteuse en milieu liquide (Corvest et al., 2013). Chez *C. albicans*, des concentrations de Caspo sub-léthales réduisent la teneur en β -glucane de la paroi cellulaire (Hopke et al., 2018 ; Walker et al., 2013). Le but de ces études est d'établir l'importance de la paroi cellulaire pour la croissance invasive en examinant des paramètres de croissance tels que la limite de rigidité du PDMS, pour laquelle la pénétration des hyphes ne se produit plus, et les vitesses d'extension des hyphes.

Il a été observé par C. Puerner que le changement de morphologie cellulaire lors de la croissance invasive est associé à une dépolarisation de Rho1 activé (Puerner et al., 2020), visualisé par un rapporteur fluorescent (Corvest et al., 2013) (Figure 4.12). De plus, des résultats préliminaires, obtenus par D. Thomson suggéraient que les filaments d'une souche hétérozygote *rho1* Δ / + invasifs paraissaient lyser davantage par rapport à la souche sauvage. Mon objectif initial était de confirmer et poursuivre la quantification de ces observations.

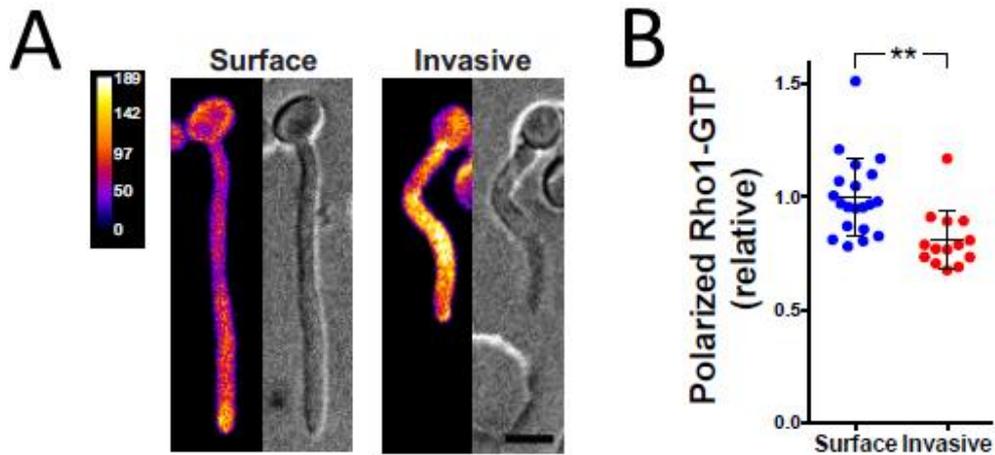


Figure 4.12 Dépolarisation de Rho1 activé lors de la croissance invasive.

A) Projections de somme et images DIC de cellules exprimant la GFP-RID après croissance sur ou dans le PDMS de 35: 1 (~ 150 kPa). Projection de somme faussement colorée. B) L'intensité du signal associé à Rho1-GTP a été déterminée à partir de 3 expériences indépendantes en temps réel (n = 14-20 cellules). Rho1-GTP polarisé est le signal apical divisé par le signal subapical (normalisé à 1). Les barres indiquent SD et ** p = 0,001. (C. Puerner)

4.2.1. Mutant *rho1*

Comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes, j'ai tout d'abord généré une souche *rho1* modifiée, qui exprime un fluorophore rouge dans le cytoplasme. La souche sauvage ne l'exprimant pas, il est donc possible d'imager les deux souches sur une même membrane de PDMS, ce qui permet ainsi une comparaison directe des changements de comportement potentiels.

Initialement, j'ai vérifié que le signal de fluorescence était stable dans le temps pour cette nouvelle souche PY4956 (*rho1* Δ / +) (Figure 4.13) :

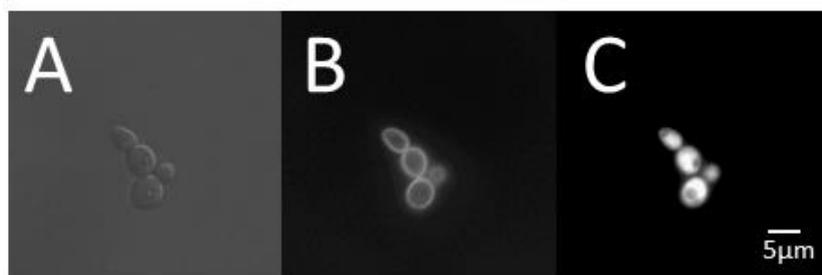


Figure 4.13 Cellules bourgeonnantes de *C. albicans* PY4956 (*rho1* Δ / +) par microscopie (Leica, 60x). Images DIC (A), de fluorescence GFP à la membrane plasmique (B) et de fluorescence mScarlet dans le cytoplasme (C).

J'ai également vérifié que les cellules de cette souche mutée *rho1* ne présentaient pas de défaut de croissance filamenteuse en milieu liquide. Pour cela, les cellules ont été induites en présence de sérum et les longueurs des filaments mesurées après 90 min d'induction (Figure 4.14 et Tableau 4.5).

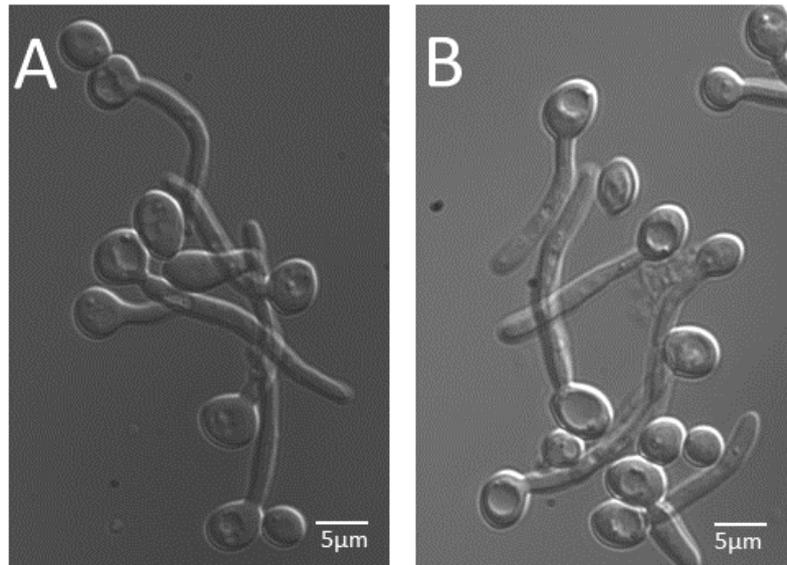


Figure 4.14 Induction de la filamentation chez la souche mutée *rho1*

Les cellules du mutant *rho1* (PY4956) (A) et de la souche sauvage (PY4887) (B) ont été induites dans une solution 50% FCS/ 50% YEDP à 37°C pendant 90 minutes. Les images ont été prises par microscope Leica en transmission, 60x.

Expérience 1	24 ± 7 µm
Expérience 2	22 ± 9 µm
Expérience 3	22 ± 8 µm

Tableau 4.5 longueur des filaments de la souche mutée *rho1* après 90 minutes d'induction.

Les valeurs de la longueur des filaments correspondent à la moyenne des longueurs de 35-45 cellules par expérience, et l'erreur est l'écart-type. A titre de comparaison la moyenne de la longueur des filaments de la souche sauvage est de 23 ± 8 µm (moyenne de 20 cellules).

Croissance sur les membranes de PDMS

Sur la Figure 4.15 on observe les cellules de *C. albicans* dans les micropuits de PDMS, en rouge ce sont des mutants *rho1* et en gris la souche sauvage.

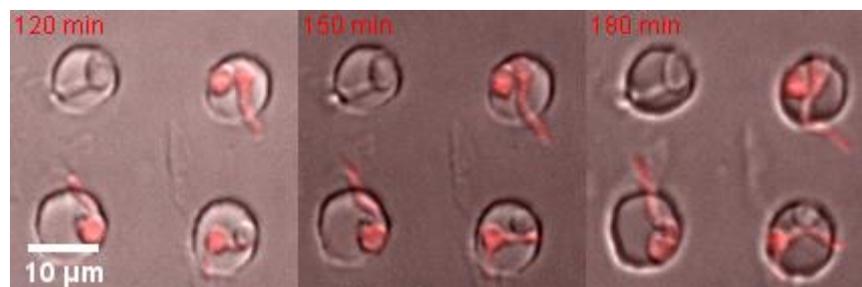


Figure 4.15 Croissance des cellules des souches sauvage et mutée *rho1* sur PDMS 35 :1.

En rouge la souche mutée, et en gris la souche sauvage, trois images prises par microscope à champ large et en fluorescence VideObserver, 40x, avec un intervalle de temps de 10 minutes.

Le tableau ci-dessous, (Tableau 4.6) indique pour chaque expérience le nombre de cellules dont la vitesse de croissance a été mesurée en surface du PDMS, le pourcentage de filamentation lors de l'induction en milieu liquide, le nombre de cellules invasives dans le PDMS, la moyenne des vitesses de croissance en surface (v_0) et de croissance invasive ($v(F)$).

PY4956 (<i>rho1</i>)	Nombre de cellules	Pourcentage de filamentation	Nombre de cellules invasives	v_0 ($\mu\text{m}/\text{min}$)	$v(F)$ ($\mu\text{m}/\text{min}$)
Expérience 1	119	70%	15	0.06	0.04
Expérience 2	56	98%	0	0.01	-
Expérience 3	98	95%	0	0.15	-
Expérience 4	51	84%	0	0.03	-
Expérience 5	63	90%	5	0.11	0.06

Tableau 4.6 Filamentation et vitesse de croissance du mutant *rho1* dans le PDMS 35 :1

Le pourcentage de filamentation des cellules en milieu d'induction liquide pour la souche mutée (~ 70-90%) est comparable à celui rapporté pour la souche sauvage et le mutant hétérozygote *rho1* (Corvest et al., 2013). Je n'ai cependant observé que très peu de cellules invasives pour la souche mutée, ne permettant malheureusement pas de déterminer si la souche hétérozygote *rho1* Δ / + lysait davantage lors de l'invasion. Il est à noter aussi que les vitesses de croissance en surface pour cette souche mutée étaient réduites (0.01 $\mu\text{m}/\text{min}$ à 0.15 $\mu\text{m}/\text{min}$), par rapport à la vitesse de croissance en surface de la souche sauvage que nous avons mesurées de l'ordre de 0.3 $\mu\text{m}/\text{min}$.

J'ai été curieuse de voir l'évolution des cellules au bout de 24 heures. Sur les images ci-dessous, on observe que les cellules en surface ont continué de croître sous forme hyphale (Figure 4.16A) ou pseudohyphale (Figure 4.16B), mais que les cellules invasives ont arrêté leur croissance, avec un filament qui semble avoir lysé (Figure 4.16C). Malheureusement, à ce stade les cellules n'étaient plus fluorescentes, rendant impossible la distinction entre cellules *rho1* et sauvages.

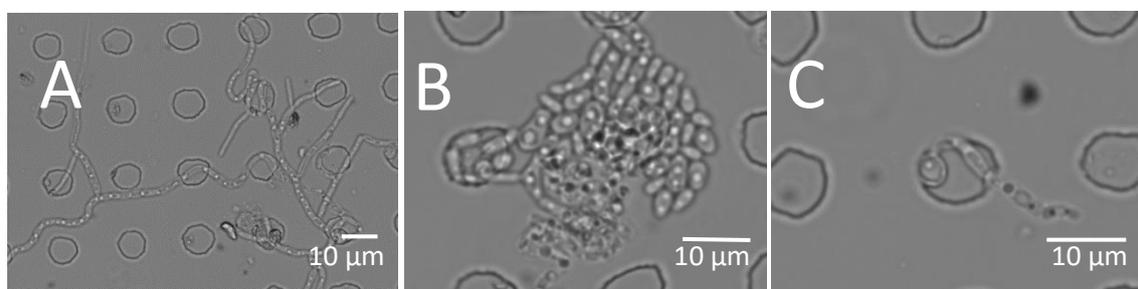


Figure 4.16 L'état des cellules de *C. albicans* après 24h de croissance sur le PDMS 35 :1

Croissance à la surface hyphale (A) et pseudohyphale (B), Croissance hyphale invasive (C).

4.2.2. Traitement à la caspofungine

La caspofungine inhibe la synthèse de β (1,3)-D-glucane, ce qui entraîne une réduction du contenu de β (1,3)-D-glucane dans la paroi cellulaire. Il a été montré que ce traitement chez *C. albicans* entraîne de façon compensatoire une augmentation du taux de mannanes et de chitine, homopolymère de *N*-acetylglucosamine (Walker *et al.*, 2008), associée à une augmentation du Young modulus, mesuré par nanoindentation (AFM) (Formosa *et al.*, 2013). Pour contrôler l'effet de la caspofungine, j'ai induit la croissance filamenteuse des cellules de la souche sauvage dans un milieu liquide contenant du sérum, avec ou sans caspofungine, et quantifié par microcopie l'intensité du signal de Calcofluor White (CFW), un fluorophore bleu qui se lie spécifiquement à la chitine.

Traitement caspofungine dans un milieu liquide

Le (Tableau 4.7) montre une augmentation de l'intensité de CFW dans les cellules traitées à la caspofungine jusqu'à une concentration de 0.035 $\mu\text{g/ml}$, par rapport aux cellules non traitées.

Concentration caspofungine	Intensité de Calcofluor White (CFW)		
	0	0,027 $\mu\text{g/ml}$	0,035 $\mu\text{g/ml}$
Expérience 1	3957 \pm 271	4433 \pm 361	5202 \pm 346
Expérience 2	3666 \pm 188	4321 \pm 758	
Expérience 3	4530 \pm 426	5092 \pm 990	5354 \pm 1119

Tableau 4.7 Intensité de Calcofluor White (CFW) sur les cellules hyphales.

Chaque valeur d'intensité de CFW correspond à une valeur moyenne sur la surface de l'hyphe après 90 minutes d'induction. Pour chaque condition les mesures ont été faites sur 20 cellules fixées, la barre d'erreur correspond à l'écart-type.

En calculant la moyenne de l'intensité des trois expériences, on obtient le graphe ci-dessous (Figure 4.17).

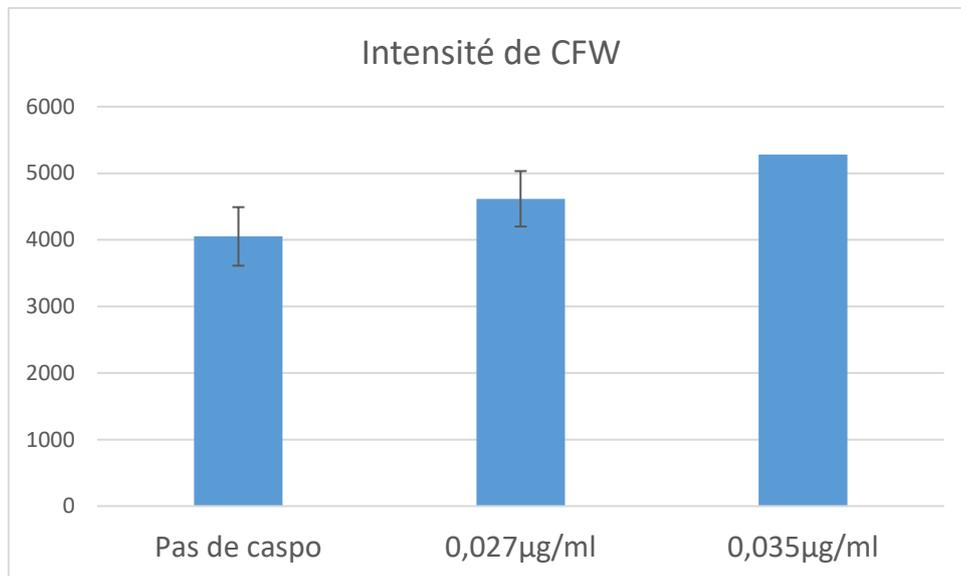


Figure 4.17 Intensité moyenne du signal de Calcofluor White (CFW) dans les cellules hyphales.

Les colonnes de caspo à 0 et 0.027µg/ml représentent la moyenne des trois expériences effectuées et les barres l'écart-type. Celle de caspo à 0.035µg/ml est la moyenne de deux expériences.

Pour les cellules traitées à ces concentrations (Figure 4.18), la morphologie des filaments, induits en présence de sérum, était similaire à celle de la souche non traitée. A des concentrations supérieures de caspofungine (0.1µg/ml), seul un faible pourcentage de cellules filamentaire (~2%), et la morphologie de ces filaments étaient altérés, comme montré sur la Figure 4.18C. Par conséquent, nous avons choisi de traiter les cellules une concentration de 0.027 µg/ml de caspofungine pour les expériences sur membranes PDMS.

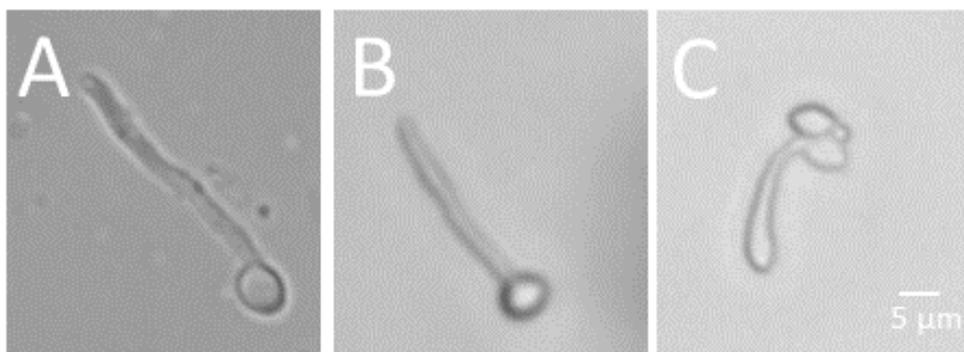


Figure 4.18 Effet du traitement caspofungine sur l'induction hyphale de *C. albicans*.

Les images ont été prises microscopie à champ large VideObserver, 60x. Cellules fixées après 90 minutes d'induction, dans les conditions : A) Sans caspo B) 0.027µg/ml C) 0.1µg/ml

Croissance sur PDMS

Pour ces expériences, j'ai suivi sur des membranes de PDMS (35 :1) le pourcentage d'invasion et les vitesses d'extension des filaments des cellules de la souche sauvage traitées ou non par de la caspofungine à 0.027µg/ml, en croissance sur et dans le PDMS (Tableau 4.8). En parallèle, l'induction de la croissance hyphale en milieu liquide a permis de contrôler la teneur en chitine après traitement au CFW. J'ai observé que les cellules avec ou sans traitement filamentaient à 100% en milieu liquide.

	PY4594 Contrôle			PY4594 0.027µg/ml caspo		
	Invasion	V ₀ (µm/min)	V(F) (µm/min)	Invasion	V ₀ (µm/min)	V(F) (µm/min)
Expérience 1	89%	0.34±0.07	0.16±0.06	32%	0.32±0.05	0.21±0.09
Expérience 2	77%	0.47±0.1	0.16±0.07	37%	0.36±0.1	0.17±0.09

Tableau 4.8 Croissance sur et dans le PDMS des cellules traitées ou non avec la caspofungine.

Par expérience 150 à 250 cellules ont été quantifiées, les valeurs de la vitesse d'extension correspondent à la moyenne mesurée sur 20 à 200 cellules.

Comme indiqué ci-dessus, le taux d'invasion du PDMS (35 :1) par les cellules traitées est plus faible (1.5 à 3 fois) que celui des cellules non traitées. En revanche, je n'ai pas observé de différence significative, entre cellules traitées et non traitées, en ce qui concerne la vitesse d'extension du filament, que ce soit pour les cellules en croissance sur la surface du PDMS ou les cellules invasives. Il faut noter également que je n'ai pas observé de lyse cellulaire durant ces expériences. Ces données préliminaires suggèrent que l'altération de la paroi cellulaire par un traitement en présence de caspofungine résulte en un défaut d'invasion des cellules.

Conclusion générale

L'objectif principal de ce projet était d'élucider comment un pathogène fongique humain, *Candida albicans* répond à des forces externes (résistives) lorsqu'il est en croissance filamenteuse. Les questions abordées dans ce projet étaient : 1) Quelles sont les forces lors de la croissance fongique invasive ? 2) Quelles sont les réponses cellulaires aux forces résistives ? 3) Des modèles physiques et mathématiques simples peuvent-ils décrire les liens entre ces forces et les caractéristiques de la croissance fongique invasive ? Que peut-on en déduire sur la pression de turgescence ?

Le travail que j'ai effectué pendant ces années, m'a permis d'abord d'explorer la physique de la perforation d'un élastomère au niveau macroscopique et de comprendre le rôle de différents paramètres comme le ratio de réticulant, la vitesse d'indentation, la nature des conditions aux bords. Cela m'a permis de confirmer que l'on peut considérer les élastomères de polydiméthylsiloxane (PDMS) comme purement élastique pour les déformations, induites par *Candida albicans*, jusqu'à sa rupture. Toutes les expériences analogiques macroscopiques m'ont permis de vérifier que l'on peut obtenir la force appliquée par le PDMS sur un hyphes invasif en soustrayant les composants d'adhésion et de friction, et que le front de fissure se propage et donc le filament combat surtout une force de rappel purement élastique. La confirmation de ces hypothèses, la fabrication et la caractérisation des membranes en PDMS, nous a permis de montrer qu'il existe un seuil de pénétration qui correspond à une rigidité de ~ 200 kPa et que la croissance invasive à l'intérieur d'un substrat rigide (PDMS) est caractérisée par un flambage spectaculaire du filament avec une diminution du taux d'extension en fonction de la rigidité. Néanmoins, un petit pourcentage de cellules est capable d'envahir des élastomères de rigidité 200 kPa, suggérant que ces cellules pourraient jouer un rôle dans l'infection. En outre, nous avons observé une modification de la morphologie cellulaire pendant la croissance invasive, qui n'est pas due aux régulateurs de la polarité cellulaire mais plutôt à la force mécanique.

Ma thèse fait partie d'un projet, qui s'inscrit dans un défi sociétal de santé au niveau de la recherche fondamentale sur les mécanismes des infections nosocomiales. Ce projet se situe à l'interface de la biologie et de la physique. Aborder des questions fondamentales en mécanobiologie fongique exigeait une approche interdisciplinaire et collaborative. Une partie des résultats et matériels de recherche ont été publiés et sont désormais partagés avec la communauté scientifique. Les connaissances fondamentales, les outils et les technologies générés dans ce projet ont un fort potentiel d'exploitation. D'un point de vue médical, une compréhension des forces impliquées dans la croissance invasive et la réponse de ce champignon pathogène humain aux forces résistives devraient révéler de nouvelles cibles antifongiques. Cela sera essentiel car l'incidence des personnes immunodéprimées et l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs augmentent.

Il reste encore beaucoup de questions auxquelles ce projet pourra répondre avec davantage de résultats et en diversifiant des expériences. Comprendre les rôles de la génération de force en réponse à une gamme de stress cellulaires, y compris l'exposition aux médicaments antifongiques, devrait aider à lutter contre cette cause majeure d'infections nosocomiales. Les données préliminaires suggèrent que l'altération de la paroi cellulaire par un traitement en présence de caspofungine résulte en un défaut d'invasion des cellules.

Perspectives

Dans un premier temps il serait intéressant d'améliorer le modèle physique, qui mime la croissance fongique. Idéalement il faudrait créer un micro-ballon qui pénétrerait dans le PDMS en gonflant, mais de façon plus réaliste, il faudrait fabriquer la membrane en PDMS à plusieurs échelles et effectuer les indentations et micro-indentations avec des sondes (en acier ou en verre, avec la même courbure, que celle de l'hyphe de *C. albicans*) avec un rayon dix fois plus petit que le diamètre de puits (cinq fois plus petit que la profondeur du puit).

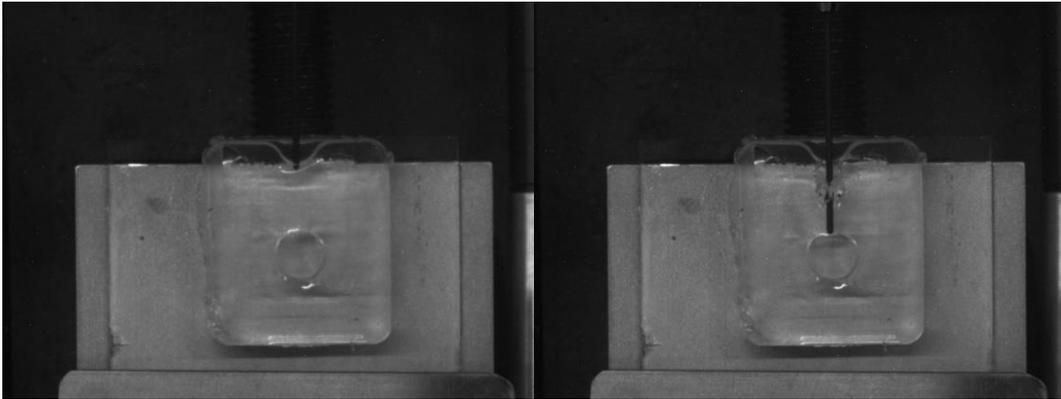


Figure 0.1 Indentation dans la membrane macroscopique en PDMS 35 :1

L'échelle entre le diamètre de la sonde et les dimensions des puits et la distance entre les puits sont les mêmes que pour *C. albicans*, le diamètre de la sonde en acier est 500 fois plus grand que celui de l'hyphe, la membrane est donc agrandie 500 fois. Le puits n'étant pas assez profonde, on observe la déflexion de la sonde, le PDMS glisse en-dessous de la sonde. Par manque de temps je n'ai pas pu solutionner ce problème et continuer la recherche dans cette direction.

Une nouvelle méthode de mesure de la force est développée dans le laboratoire. Cette méthode est une adaptation de la technique de « Traction Force Microscopy (TFM) ». La microscopie à force de traction est une méthode expérimentale, qui consiste à disperser des billes fluorescentes dans le substrat et suivre le mouvement de ces dernières pendant qu'une cellule se déplace à sa surface. Pour déterminer les tractions à la surface d'une cellule il faut résoudre un problème inverse et remonter à la force à partir du champ de déplacement. En faisant la micro-indentation sur les membranes en PDMS avec des billes fluorescentes, il serait possible de contrôler la contrainte appliquée et de mesurer le champ de déplacement des billes. A partir de ces déplacements de billes pendant l'invasion de *C. albicans*, on pourrait remonter à la force appliquée par l'hyphe.

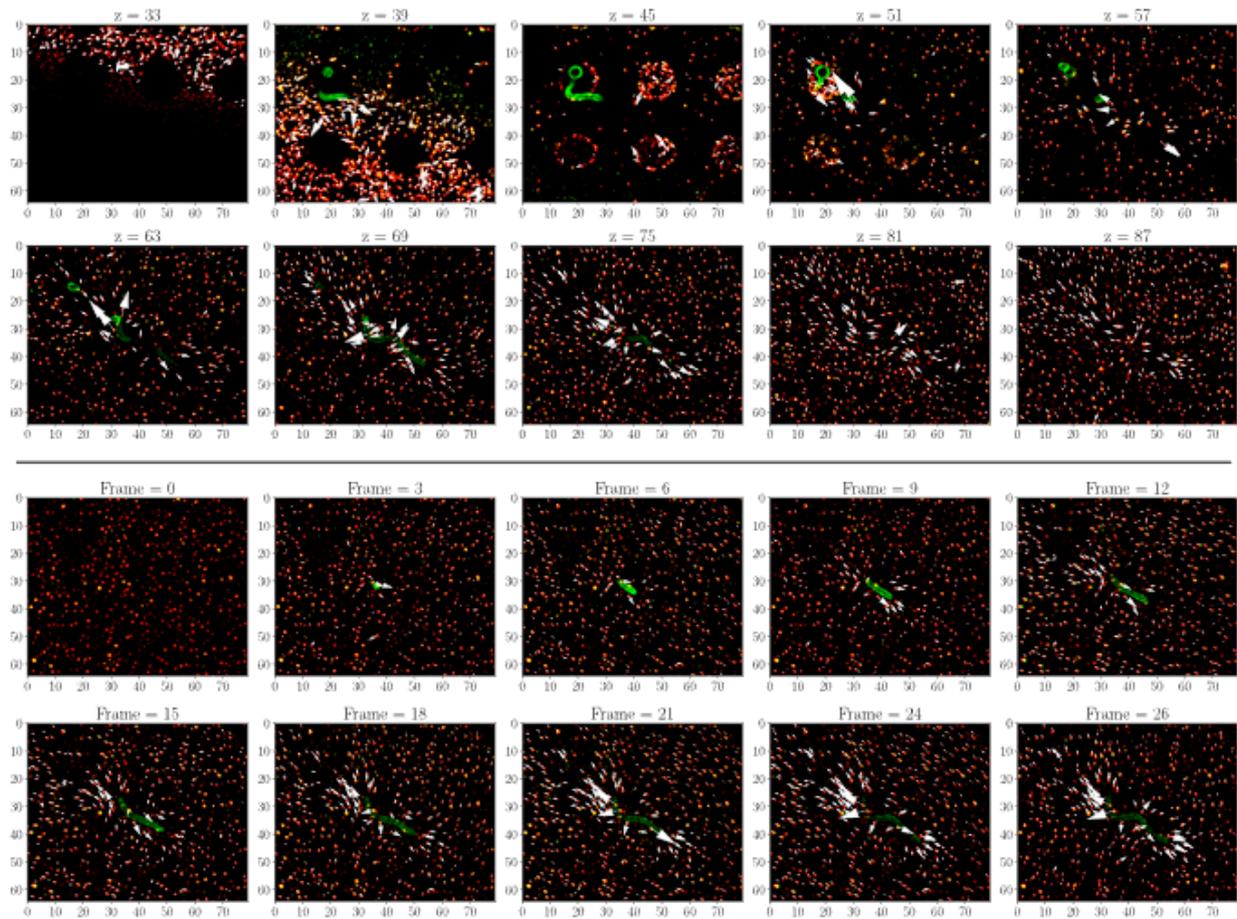


Figure 0.2 Invasion de *C. albicans* dans la membrane de PDMS avec des billes fluorescentes. Images : Nicolas Bruot, Charlie Puerner.

Les cellules de *C. albicans* sont-elles capables de reconnaître la rigidité de leur environnement ? et croissent-elles dans une direction préférentielle en fonction de la rigidité du substrat ? Adaptent-elles leur rigidité en fonction de celle du substrat, comme les cellules de mammifères (Solon et al., 2007) ? Pour répondre à cette question de façon quantitative on pourrait faire pousser ces cellules sur une membrane de PDMS (sans puits) ayant un gradient de rigidité. Les faire pousser sur une membrane avec des puits espacés de $15\mu\text{m}$ (comme dans les membranes utilisées pendant ma thèse) dans une direction (x) et très éloignés ($\sim 60\mu\text{m}$) dans l'autre direction (y) et observer la direction de leur croissance, apporterait également une partie de réponses.

Remerciements

J'ai commencé à travailler sur ce projet il y a maintenant quatre ans, mais ce travail de thèse est un aboutissement d'un travail beaucoup plus long. Ce ne fut pas toujours facile, et même souvent difficile. Il y eut des hauts et des bas, des jours avec et des jours sans, des événements tristes comme des joyeux, des petits détails, des imprévus et un certain nombre de sacrifices qui ont fait que j'en suis là aujourd'hui. Heureusement, une thèse ce n'est jamais seul qu'on la vit. Cette aventure est réussie pour moi grâce aux merveilleuses personnes que j'ai rencontrées, qui m'ont inspirée et permise d'en arriver là.

Mes premières pensées vont à vous, vous qui êtes en train de lire ma thèse. J'espère tellement que mon travail vous sera intéressant, inspirant et utile pour apporter, à mon échelle, une pierre à l'édifice.

Tout d'abord, je voudrais remercier, l'ensemble des membres de mon jury, Arezki Boudaoud, Catherine Villard et Jacques Dumais. Merci d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de mon doctorat. Merci pour votre curiosité et bienveillance.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont directement ou indirectement participées à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à mon directeur de thèse, Xavier Noblin et à ma co-directrice, Martine Bassilana. Vous avez accepté de me prendre en thèse sans me connaître et sur CE sujet qui me tient tant à cœur. Vous m'avez accueilli et suivi l'évolution de mon travail mais surtout fait grandir scientifiquement à vos côtés. Xavier, merci pour tout. Les mots me manquent pour te faire part de tout ce que je voudrais te dire. Merci Martine, pour ton soutien, pour tes conseils, que ce soit pour la science ou plus personnellement.

Un grand merci aussi à Rob Arkowitz et Agnese Seminara. Votre investissement a été indéfectible et collaborer avec vous fut véritablement enrichissant.

Je tiens à remercier très chaleureusement Charlie, la personne avec qui on a partagé le projet. On s'est épaulés, on s'est formés à des différentes techniques, on a pratiqué ensemble des expériences, on a partagé beaucoup de conversations intéressantes comme des moments de fous rires intenses. Un grand merci à Nicolas qui a suivi l'évolution de ma thèse. Tu te seras investi jusqu'au bout.

Quel plaisir d'avoir travaillé dans les mêmes laboratoires que vous, alors merci à l'intégralité de mes équipes en bio et en physique : Charlie, Miguel, Hayet, Stéphanie, Rocio, Céline, Philippe, Yann, Quang, Nicolas, Marie, Tom, Lorenzo, Chiara et Martina. Vous avez su créer un environnement très convivial.

Merci également aux membres de mon comité de suivi de thèse, Christophe, Fabrice, Mathias, Matteo et Nicolas, pour leurs conseils, leurs encouragements et leur investissement. Une attention particulière pour Sébastien, ta gentillesse, ton écoute, tes conseils ont été d'une aide précieuse. Tu m'as accordé ton soutien et les mots ne suffisent pas pour traduire la reconnaissance que je te porte. Un grand merci à Bertrand d'avoir été mon mentor et m'avoir appris autant sur la vie professionnelle.

Une pensée profonde pour Bernard, Cyrille, Denise, Florent, Greg, Jérôme, Konstanze, Madalena, Nathalie, Olga, Pavel et Stéphanie, qui ont toujours pris le temps pour m'aider (et pour discuter de tout et de rien), tout au long de cette thèse. Merci à l'ensemble des personnes que j'ai croisé dans les couloirs des laboratoires avec qui j'ai pu papoter et/ou échanger des bonjours et des sourires sincères.

Ma chère Yaroslava, tu m'as formée pour toutes les expérimentations en salle blanche. Nous aurons beaucoup travaillé ensemble, mais nos rapports ne se sont pas limités à cela. Nombre de fois je suis venue me réfugier dans ton bureau pour qu'on ne voit pas que je venais de pleurer, pour calmer ma colère, pour partager mes joies ou juste une tasse de thé. Tu as toujours su trouver des mots apaisants, on a bien rigolé aussi. Tu as certainement été la clef de l'aboutissement de cette thèse, cela n'aurait été possible sans toi.

Cette période de thèse a été marqué par des rencontres avec des personnes intéressantes dont certaines ont débouché sur de nouvelles amitiés.

Panos, Chiara, Sihem, Martin, Manu et Guido, vous étiez toujours là, pour me donner des conseils scientifiques, relationnels ou sur la vie, pour me faire rire, pour discuter des sujets socio-culturels, quelquefois assez tendues. Merci d'avoir partagé quelques danses avec moi, merci de m'avoir toujours accueillie par un sourire ensoleillé, merci pour votre bienveillance et votre humour, merci pour tous ces souvenirs merveilleux.

Un merci très particulier à Martina et à Marie (qui m'a corrigé cette partie). Martina, on a partagé, la même équipe MIMIC, la même équipe d'accueil en bio (Arkowitz), le bureau, la salle de manip, des rires,

des larmes et des bouteilles de vins, merci pour tous ces moments. Marie, tu auras été un soutien et encouragement irremplaçable, qui m'as permise d'aboutir à cette rédaction, merci pour ta générosité et pour ta confiance.

Ces amitiés m'ont donné la force de tenir durant cette aventure et elles resteront à jamais l'un des plus gros cadeaux que cette thèse m'a faits. J'ai l'honneur de vous avoir comme amis. Merci pour ce soutien, je sais que je peux compter sur vous et je serai toujours là pour vous !

Mes journées aux laboratoires commençaient dans mon bureau. Ce fut le bureau le plus bruyant, le plus conviviale, dont il y sortait de sacrés fous rires régulièrement, mais aussi quelques tensions plus rarement. C'est le bureau le plus fréquenté par les directeurs de thèses, dont le tableau est toujours recouvert d'idées scientifiques comme des touches d'humour. C'est grâce à vous qui étiez déjà là avant mon arrivé Florent, Martin, Martina et Khalid, à vous qui étiez de passage, Dorian, Joffroy, Yannel, et à vous les nouveaux arrivés Alec, Lorenzo, Mohamad et Romain. Un grand merci à vous tous pour tous ses moments.

Une pensée particulière pour l'ensemble des thésards et post-docs des labos, notamment pour Adèle, Angela, Bruno, Djeylan, Eli, Enzo, François, JB, Kavya, Léandre, Lisa, Nicola, Omar et Xin, vous avez rendu mon quotidien plus léger, agréable, vous l'avez rempli de conversations intéressantes, avec des bons moments. Vous avez fait que cette thèse est un petit peu ce qu'elle est.

C'est bien avant ma thèse, que plusieurs personnes merveilleuses semèrent la graine de l'ambition, du courage et me donnèrent la force et les moyens de changer ma vie, quitter mon pays pour mes études et m'intégrer en France, et je tiens à les remercier.

Merci à tous mes enseignants, pour avoir suscité en moi la curiosité pour la science et cette envie de recherche, cette envie de m'ouvrir au monde.

Catherine, lorsque je suis arrivée en France, tu m'as accueillie chaleureusement, tu es devenue ma famille française, la présence maternelle dans ma vie. Je ne saurais jamais te remercier pour cette amitié et cet amour, ce soutien, j'ai de la chance inouïe de t'avoir dans ma vie, avec tes filles, Mathilde et Maud.

Je souhaite remercier également Alex, Artur, Jorgen, Marion et Sofia, mes amis extraordinaires ! Sandrine, tu éveille en moi « madame bonheur » (comme tu m'as surnommé), merci de philosopher avec

moi, merci pour tous nos fous rires et des bons plats partagés. Natia, que le monde aille vers le mieux ou vers le pire, je sais qu'on sera toujours là l'une pour l'autre, merci pour ton soutien solide.

A ma famille, d'un somptueux soutien de loin, mais du cœur, des tous petits ou des plus grands : mamies, tantes, oncles, cousines, cousins et neveux, beaucoup trop nombreux pour vous nommer tous, merci pour votre amour et votre amitié. J'ai de la chance avoir une famille aussi grande, éclectique et soudée.

Quand je suis partie de Géorgie, mamie, tu as décidé de te mettre au Skype et aux réseaux sociaux, merci pour cet effort que tu as fait pour moi. Tu es certainement la personne la plus résiliente que j'ai rencontré dans ma vie, tu me donnes l'exemple et m'encourages à ne jamais baisser les bras. Merci mamie de m'inspirer.

Pour finir, une attention particulière pour ma sœur et mon frère. Tamta, merci d'avoir toujours cru en moi, tu me donnes la force d'être une meilleure version de moi. Levan, tu es la personne pour qui je veux un meilleur monde, tu es la motivation de tous mes actes. Je me serai battue pour avoir autant de force pour réussir et je continuerai à me battre pour notre avenir florissant. Il n'y a pas de mots pour exprimer tout ce que vous m'avez donné et apporté et la fierté que j'ai de vous avoir comme sœur et frère.

Enfin mes parents...

Papa, tu m'as appris à affronter mes peurs, à être indépendante, tu m'as donné la valeur de l'éducation et tu m'as offert la chance d'une meilleure vie, merci d'être mon pilier.

Maman, merci pour ton amour inconditionnel ! L'amour, qui vit en moi, qui me ressource encore après tant d'années... l'amour qui me donne le courage d'être vulnérable, la capacité de voir la beauté dans les détails, la force de me relever à chaque fois que je tombe, l'amour qui me rend libre et me fait aimer la vie.

MERCI !

Bibliographie

- Abenza, J.F., Couturier, E., Dodgson, J., Dickmann, J., Chessel, A., Dumais, J., and Salas, R.E.C. (2015). Wall mechanics and exocytosis define the shape of growth domains in fission yeast. *Nature Communications* 6.
- Ali, I.E.B. (2017). Wetting, Adhesion and friction investigations of hetero-chemical smooth patterned surfaces. PhD Thesis.
- Alonso, J.L., and Goldmann, W.H. (2003). Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sciences* 72, 2553–2560.
- Atilgan, E., Magidson, V., Khodjakov, A., and Chang, F. (2015). Morphogenesis of the Fission Yeast Cell through Cell Wall Expansion. *Current Biology* 25, 2150–2157.
- Barney, C.W., Dougan, C.E., McLeod, K.R., Kazemi-Moridani, A., Zheng, Y., Ye, Z., Tiwari, S., Sacligil, I., Riggleman, R.A., Cai, S., et al. (2020). Cavitation in soft matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 9157–9165.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D.D., Gierz, G., López-Franco, R., and Bracker, C. (1995). Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha : a test of the hyphoid model. *Experimental Mycology* 19, 153–159.
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C.E., Gierz, G., López-Franco, R., and Lu, H. (2000). Mapping the growth of fungal hyphae: orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor. *Biophysical Journal* 79, 2382–2390.
- Basmacıyan, L., Bon, F., Paradis, T., Lapaquette, P., and Dalle, F. (2019). “*Candida Albicans* Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier.” *Tissue Barriers* 7, 1612661.
- Bassilana, M., Puerner, C., and Arkowitz, R.A. (2020). External signal–mediated polarized growth in fungi. *Current Opinion in Cell Biology* 62, 150–158.
- Basso, V., d’Enfert, C., Znaidi, S., and Bachellier-Bassi, S. (2018). From Genes to Networks: The Regulatory Circuitry Controlling *Candida albicans* Morphogenesis. In *Fungal Physiology and Immunopathogenesis*, M.L. Rodrigues, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 61–99.
- Bastmeyer, M., Deising, H.B., and Bechinger, C. (2002). Force Exertion in Fungal Infection. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 31, 321–341.
- Bausch, A.R., Möller, W., and Sackmann, E. (1999). Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophysical Journal* 76, 573–579.
- Beauzamy, L., Nakayama, N., and Boudaoud, A. (2014). Flowers under pressure: ins and outs of turgor regulation in development. *Annals of Botany* 114, 1517–1533.

- Beauzamy, L., Derr, J., and Boudaoud, A. (2015). Quantifying Hydrostatic Pressure in Plant Cells by Using Indentation with an Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal* 108, 2448–2456.
- Bechinger, C., Giebel, K-F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising H. B., Bastmeyer M., (1999) Optical Measurements of Invasive Forces Exerted by Appressoria of a Plant. *Pathogenic Fungus.Science* 285.
- Béfahy, S., Lipnik, P., Pardoën, T., Nascimento, C., Patris, B., Bertrand, P., and Yunus, S. (2010). Thickness and Elastic Modulus of Plasma Treated PDMS Silica-like Surface Layer. *Langmuir* 26, 3372–3375.
- Boudaoud, A. (2003). Growth of Walled Cells: From Shells to Vesicles. *Physical Review Letters* 91.
- Bovio, S., Long, Y., and Monéger, F. (2019). Use of Atomic Force Microscopy to Measure Mechanical Properties and Turgor Pressure of Plant Cells and Plant Tissues. *Journal of Visualized Experiments*.
- Brown, X.Q., Ookawa, K., and Wong, J.Y. (2005). Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response. *Biomaterials* 26, 3123–3129.
- Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A.S., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L., et al. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657–662.
- Caballero-Lima, D., Kaneva, I.N., Watton, S.P., Sudbery, P.E., and Craven, C.J. (2013). The Spatial Distribution of the Exocyst and Actin Cortical Patches Is Sufficient To Organize Hyphal Tip Growth. *Eukaryotic Cell* 12, 998–1008.
- Campàs, O., and Mahadevan, L. (2009). Shape and Dynamics of Tip-Growing Cells. *Current Biology* 19, 2102–2107.
- Carrillo, F., Gupta, S., Balooch, M., Marshall, S.J., Marshall, G.W., Pruitt, L., and Puttlitz, C.M. (2005). Nanoindentation of polydimethylsiloxane elastomers: Effect of crosslinking, work of adhesion, and fluid environment on elastic modulus. *Journal of Materials Research* 20, 2820–2830.
- Chang, F. (2001). Establishment of a cellular axis in fission yeast. *TRENDS in Genetics* 17, 273–278.
- Chopin, J. (2010). Statique et dynamique d'un front de fissure en milieu hétérogène. PhD Thesis.
- Costa-de-Oliveira, S., and Rodrigues, A.G. (2020). *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms* 8, 154.

- Cottier, F., and Hall, R.A. (2020). Face/Off: The Interchangeable Side of *Candida Albicans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9.
- Dalle, F., Wächter, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., Labruère, C., Bonnin, A., and Hube, B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular Microbiology* 12, 248–271.
- Davì, V., and Minc, N. (2015). Mechanics and morphogenesis of fission yeast cells. *Current Opinion in Microbiology* 28, 36–45.
- Davì, V., Tanimoto, H., Ershov, D., Haupt, A., De Belly, H., Le Borgne, R., Couturier, E., Boudaoud, A., and Minc, N. (2018). Mechanosensation Dynamically Coordinates Polar Growth and Cell Wall Assembly to Promote Cell Survival. *Developmental Cell* 45, 170–182.e7.
- Davì, V., Chevalier, L., Guo, H., Tanimoto, H., Barrett, K., Couturier, E., Boudaoud, A., and Minc, N. (2019). Systematic mapping of cell wall mechanics in the regulation of cell morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 13833–13838.
- Demichelis, A., Pavarelli, S., Mortati, L., Sassi, G., and Sassi, M. (2013). Study on the AFM Force Spectroscopy method for elastic modulus measurement of living cells. *Journal of Physics: Conference Series* 459, 012050.
- Desai, J., Cheng, S., Ying, T., Nguyen, M., Clancy, C., Lanni, F., and Mitchell, A. (2015). Coordination of *Candida albicans* Invasion and Infection Functions by Phosphoglycerol Phosphatase Rhr2. *Pathogens* 4, 573–589.
- Dichtl, K., Samantaray, S., and Wagener, J. (2016). Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi: CWI signalling in pathogenic fungi. *Cellular Microbiology* 18, 1228–1238.
- Dumais, J., and Forterre, Y. (2012). “Vegetable Dynamicks”: The Role of Water in Plant Movements. *Annual Review of Fluid Mechanics* 44, 453–478.
- Eggen, E., Niels de Keijzer, M., and Mulder, B.M. (2011). Self-regulation in tip-growth: The role of cell wall ageing. *Journal of Theoretical Biology* 283, 113–121.
- Élastomère. (2019, juillet 17). *Wikipédia, l'encyclopédie libre*. Page consultée le 11:10, juillet 17, 2019
- Ene, I.V., Adya, A.K., Wehmeier, S., Brand, A.C., MacCallum, D.M., Gow, N.A.R., and Brown, A.J.P. (2012). Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen: Carbon source, fungal virulence and stress responses. *Cellular Microbiology* 14, 1319–1335.
- Ene, I.V., Walker, L.A., Schiavone, M., Lee, K.K., Martin-Yken, H., Dague, E., Gow, N.A.R., Munro, C.A., and Brown, A.J.P. (2015). Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. *mBio* 6.
- Ene, I.V., Bennett, R.J., and Anderson, M.Z. (2019). Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* 52, 47–54.

- Fakhouri, S., Hutchens, S.B., and Crosby, A.J. (2015). Puncture mechanics of soft solids. *Soft Matter* 11, 4723–4730.
- Fakhouri, S., (2015) Cavitation and Puncture for Mechanical Measurement of Soft Solids. PhD Thesis.
- Feltrin, E. (2013). Surfaces PDMS structurées et/ou décorées par des nanoparticules: vers des propriétés optiques et de mouillage modulables. PhD Thesis.
- Formosa, C., Schiavone, M., Martin-Yken, H., François, J.M., Duval, R.E., and Dague, E. (2013). Nanoscale Effects of Caspofungin against Two Yeast Species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 3498–3506.
- Fuard, D., Tzvetkova-Chevolleau, T., Decossas, S., Tracqui, P., and Schiavone, P. (2008). Optimization of poly-di-methyl-siloxane (PDMS) substrates for studying cellular adhesion and motility. *Microelectronic Engineering* 85, 1289–1293.
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H.C., Rivera, J., and Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Geitmann, A. (2006). Experimental approaches used to quantify physical parameters at cellular and subcellular levels. *American Journal of Botany* 93, 1380–1390.
- Goriely, A., and Tabor, M. (2003). Biomechanical models of hyphal growth in actinomycetes. *Journal of Theoretical Biology* 222, 211–218.
- Gow, N.A., and Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology* 15, 406–412.
- Green, P.B., and Stanton, F.W. (1967). Turgor pressure: direct manometric measurement in single cells of *Nitella*. *Science* 155, 1675–1676.
- Gupta, S., Carrillo, F., Li, C., Pruitt, L., and Puttlitz, C. (2007). Adhesive forces significantly affect elastic modulus determination of soft polymeric materials in nanoindentation. *Materials Letters* 61, 448–451.
- Halary J-L, Laupretre F., Monnerie L., *Mécanique des matériaux polymères*. Belin Education Echelles 2008
- Hall, R.A. (2015). Dressed to impress: impact of environmental adaptation on the *Candida albicans* cell wall: Environmental impact on the fungal cell wall. *Molecular Microbiology* 97, 7–17.
- Haupt, A., and Minc, N. (2018). How cells sense their own shape – mechanisms to probe cell geometry and their implications in cellular organization and function. *Journal of Cell Science* 131, jcs214015.
- Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A., and Gallet, F. (1999). A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers. *Biophysical Journal* 76, 1145–1151.

- Hernández-Chávez, M., Pérez-García, L., Niño-Vega, G., and Mora-Montes, H. (2017). Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. *Journal of Fungi* 3, 51.
- Heitman, Howlett, Crous, Stukenbrock, James, and Gow, eds. (2017). Fungi that Infect Humans. In *The Fungal Kingdom*, (American Society of Microbiology), pp. 813–843.
- Heitman, Howlett, Crous, Stukenbrock, James, and Gow, eds. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. In *The Fungal Kingdom*,(American Society of Microbiology), pp. 267–292.
- Hittinger, C.T., Rokas, A., Bai, F.-Y., Boekhout, T., Gonçalves, P., Jeffries, T.W., Kominek, J., Lachance, M.-A., Libkind, D., Rosa, C.A., et al. (2015). Genomics and the making of yeast biodiversity. *Current Opinion in Genetics & Development* 35, 100–109.
- Hochmuth, R.M. (2000). Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics* 33, 15–22.
- Höfs, S., Mogavero, S., and Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology* 54, 149–169.
- Hopke, A., Brown, A.J.P., Hall, R.A., and Wheeler, R.T. (2018). Dynamic Fungal Cell Wall Architecture in Stress Adaptation and Immune Evasion. *Trends in Microbiology* 26, 284–295.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H., and Money, N.P. (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 11281–11284.
- Hüsken, D., Steudle, E., and Zimmermann, U. (1978). Pressure probe technique for measuring water relations of cells in higher plants. *Plant Physiology* 61, 158–163.
- Jonathan Richardson, Jemima Ho, and Julian Naglik (2018). *Candida*–Epithelial Interactions. *Journal of Fungi* 4, 22.
- de Jong, T.G., Hulshof, J., and Prokert, G. (2020). Modelling fungal hypha tip growth via viscous sheet approximation. *Journal of Theoretical Biology* 492, 110189.
- Kadosh, D., and Mundodi, V. (2020). A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* Species. *Journal of Fungi* 6, 13.
- Kang, J., Wang, C., and Cai, S. (2017). Cavitation to fracture transition in a soft solid. *Soft Matter* 13, 6372–6376.
- Kim, B., Lee, S.B., Lee, J., Cho, S., Park, H., Yeom, S., and Park, S.H. (2012). A comparison among Neo-Hookean model, Mooney-Rivlin model, and Ogden model for chloroprene rubber. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing* 13, 759–764.
- Knafler, H.C., Smaczynska-de Rooij, I.I., Walker, L.A., Lee, K.K., Gow, N.A.R., and Ayscough, K.R. (2019). AP-2-Dependent Endocytic Recycling of the Chitin Synthase Chs3 Regulates Polarized Growth in *Candida albicans*. *mBio* 10.

- Kondoh, O., Tachibana, Y., Ohya, Y., Arisawa, M., and Watanabe, T. (1997). Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1, 3-glucan synthesis. *Journal of Bacteriology* *179*, 7734–7741.
- Kornitzer, D. (2019). Regulation of *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis by Endogenous Signals. *Journal of Fungi* *5*, 21.
- Kundan, K.K., and Ghatak, A. (2018). The effect of shape on the fracture of a soft elastic gel subjected to shear load. *Soft Matter* *14*, 1365–1374.
- Kuo, A.C. (1999). Poly (dimethylsiloxane). *Polymer Data Handbook* 411–435.
- Lavoie, S.R., Long, R., and Tang, T. (2016). A rate-dependent damage model for elastomers at large strain. *Extreme Mechanics Letters* *8*, 114–124.
- Lew, R.R. (2011). How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. *Nature Reviews Microbiology* *9*, 509–518.
- Li, Q., Dimaki, A., Popov, M., Psakhie, S.G., and Popov, V.L. (2015). Kinetics of the coefficient of friction of elastomers. *Scientific Reports* *4*.
- Lintilhac, P.M., Wei, C., Tanguay, J.J., and Outwater, J.O. (2000a). Ball Tonometry: A Rapid, Nondestructive Method for Measuring Cell Turgor Pressure in Thin-Walled Plant Cells. *Journal of Plant Growth Regulation* *19*, 90–97.
- Lintilhac, P.M., Wei, C., Tanguay, J.J., and Outwater, J.O. (2000b). Ball Tonometry: A Rapid, Nondestructive Method for Measuring Cell Turgor Pressure in Thin-Walled Plant Cells. *Journal of Plant Growth Regulation* *19*, 90–97.
- Liu, J., Chen, Z., Liang, X., Huang, X., Mao, G., Hong, W., Yu, H., and Qu, S. (2018). Puncture mechanics of soft elastomeric membrane with large deformation by rigid cylindrical indenter. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* *112*, 458–471.
- Liu, M., Sun, J., and Chen, Q. (2009). Influences of heating temperature on mechanical properties of polydimethylsiloxane. *Sensors and Actuators A: Physical* *151*, 42–45.
- Lockhart, J.A. (1965). An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* *8*, 264–275.
- Mani, S. (2011). Fundamentals aspects of crosslinking control of PDMS rubber at high temperatures using TEMPO nitroxide.
- Mathur, A.B., Collinsworth, A.M., Reichert, W.M., Kraus, W.E., and Truskey, G.A. (2001). Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *Journal of Biomechanics* *34*, 1545–1553.
- Matyjaszewski, K. (2012). Atom transfer radical polymerization (ATRP): current status and future perspectives. *Macromolecules* *45*, 4015–4039.

- Mendgen, K., Hahn, M., and Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* *34*, 367–386.
- Miller, S.E., Spurlock, B.O., and Michaels, G.E. (1974). Electron microscopy of young *Candida albicans* chlamydospores. *Journal of Bacteriology* *119*, 992–999.
- Minc, N. (2014). Microfabricated Chambers as Force Sensors for Probing Forces of Fungal Growth. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 215–226.
- Minc, N., Boudaoud, A., and Chang, F. (2009). Mechanical Forces of Fission Yeast Growth. *Current Biology* *19*, 1096–1101.
- Money, N.P. (1990). Measurement of hyphal turgor. *Experimental Mycology* *14*, 416–425.
- Money, N.P. (1995). Turgor pressure and the mechanics of fungal penetration. *Canadian Journal of Botany* *73*, 96–102.
- Moyes, D.L., and Naglik, J.R. (2011). Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection. *Clinical and Developmental Immunology* *2011*, 1–9.
- Miyoshi M. 1895. Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrb. Wiss. Bot.* *28*:269–89
- Mülhaupt, R. (2004). Hermann Staudinger and the Origin of Macromolecular Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* *43*, 1054–1063.
- Naranjo-Ortiz, M.A., and Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews* *94*, 2101–2137.
- Nguyen, C.T., and Vu-Khanh, T. (2004). Mechanics and mechanisms of puncture of elastomer membranes. *Journal of Materials Science* *39*, 7361–7364.
- Nguyen, C.T., and Vu-Khanh, T. (2009). Mechanics and mechanisms of puncture by medical needles. *Procedia Engineering* *1*, 139–142.
- Pan, Y., Zhan, Y., Ji, H., Niu, X., and Zhong, Z. (2016). Can hyperelastic material parameters be uniquely determined from indentation experiments? *RSC Advances* *6*, 81958–81964.
- Perez-Nadales, E., Almeida Nogueira, M.F., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E., Lengeler, K., Marchegiani, E., Mehrotra, P.V., Moretti, M., et al. (2014). Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genetics and Biology* *70*, 42–67.
- Persson, B.N.J. (2011). *Sliding friction: physical principles and applications* (Berlin; London: Springer).
- Persson, B.N.J., Albohr, O., Heinrich, G., and Ueba, H. (2005). Crack propagation in rubber-like materials. *Journal of Physics: Condensed Matter* *17*, R1071–R1142.

- Placet, V., and Delobelle, P. (2015). Mechanical properties of bulk polydimethylsiloxane for microfluidics over a large range of frequencies and aging times. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 25, 035009.
- Pristov, K.E., and Ghannoum, M.A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection* 25, 792–798.
- Puerner, C., Kukhaleishvili, N., Thomson, D., Schaub, S., Noblin, X., Seminara, A., Bassilana, M., and Arkowitz, R.A. (2020). Mechanical force-induced morphology changes in a human fungal pathogen. *BMC Biology* 18.
- Rattan, S., and Crosby, A.J. (2018). Effect of far-field compliance on local failure dynamics of soft solids. *Extreme Mechanics Letters* 24, 14–20.
- Rattan, S., and Crosby, A.J. (2019). Effect of Polymer Volume Fraction on Fracture Initiation in Soft Gels at Small Length Scales. *ACS Macro Letters* 492–498.
- Rattan, S., Li, L., Lau, H.K., Crosby, A.J., and Kiick, K.L. (2018). Micromechanical characterization of soft, biopolymeric hydrogels: stiffness, resilience, and failure. *Soft Matter* 14, 3478–3489.
- Ringsdorf, H. (2004). Hermann Staudinger and the Future of Polymer Research Jubilees—Beloved Occasions for Cultural Piety. *Angewandte Chemie International Edition* 43, 1064–1076.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G.H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., et al. (2018). Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82.
- Rivlin, R.S., and Thomas, A.G. (1953). Rupture of rubber. I. Characteristic energy for tearing. *Journal of Polymer Science* 10, 291–318.
- Roncero, C., and Vázquez de Aldana, C.R. (2019). *Glucanases and Chitinases*. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), p.
- Sherrington, S.L., Sorsby, E., Mahtey, N., Kumwenda, P., Lenardon, M.D., Brown, I., Ballou, E.R., MacCallum, D.M., and Hall, R.A. (2017). Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *PLoS Pathogens* 13, e1006403.
- Shin, J.H., Tam, B.K., Brau, R.R., Lang, M.J., Mahadevan, L., and Matsudaira, P. (2007). Force of an Actin Spring. *Biophysical Journal* 92, 3729–3733.
- Silva, P.M., Puerner, C., Seminara, A., Bassilana, M., and Arkowitz, R.A. (2019). Secretory Vesicle Clustering in Fungal Filamentous Cells Does Not Require Directional Growth. *Cell Reports* 28, 2231–2245.e5.
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P.C., and Janmey, P.A. (2007). Fibroblast Adaptation and Stiffness Matching to Soft Elastic Substrates. *Biophysical Journal* 93, 4453–

4461.

Song, J.C., and Stevens, D.A. (2016). Caspofungin: Pharmacodynamics, pharmacokinetics, clinical uses and treatment outcomes. *Critical Reviews in Microbiology* 42, 813–846.

Tayagui, A., Sun, Y., Collings, D.A., Garrill, A., and Nock, V. (2017a). An elastomeric micropillar platform for the study of protrusive forces in hyphal invasion. *Lab Chip* 17, 3643–3653.

Thomson, D.D., Wehmeier, S., Byfield, F.J., Janmey, P.A., Caballero-Lima, D., Crossley, A., and Brand, A.C. (2015). Contact-induced apical asymmetry drives the thigmotropic responses of *Candida albicans* hyphae: Asymmetry drives thigmotropic responses. *Cellular Microbiology* 17, 342–354.

Thomson, D.D., Berman, J., and Brand, A.C. (2016). High frame-rate resolution of cell division during *Candida albicans* filamentation. *Fungal Genetics and Biology* 88, 54–58.

Vauchelles, R., Stalder, D., Botton, T., Arkowitz, R.A., and Bassilana, M. (2010). Rac1 Dynamics in the Human Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *PLoS ONE* 5, e15400.

Vila, T., Sultan, A.S., Montelongo-Jauregui, D., and Jabra-Rizk, M.A. (2020). Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *Journal of Fungi* 6, 15.

Wächtler, B., Citiulo, F., Jablonowski, N., Förster, S., Dalle, F., Schaller, M., Wilson, D., and Hube, B. (2012). *Candida albicans*-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process. *PLoS ONE* 7, e36952.

Walker, L., Sood, P., Lenardon, M.D., Milne, G., Olson, J., Jensen, G., Wolf, J., Casadevall, A., Adler-Moore, J., and Gow, N.A. (2018). The viscoelastic properties of the fungal cell wall allow traffic of AmBisome as intact liposome vesicles. *MBio* 9, e02383–17.

Walker, L.A., Munro, C.A., de Bruijn, I., Lenardon, M.D., McKinnon, A., and Gow, N.A.R. (2008). Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. *PLoS Pathogens* 4, e1000040.

Walker, L.A., Gow, N.A.R., and Munro, C.A. (2010). Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology* 47, 117–126.

Walker, L.A., Gow, N.A.R., and Munro, C.A. (2013). Elevated Chitin Content Reduces the Susceptibility of *Candida* Species to Caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 146–154.

Wang, C.X. (2004). Modelling the Mechanical Properties of Single Suspension-Cultured Tomato Cells. *Annals of Botany* 93, 443–453.

Wang, Z., Volinsky, A.A., and Gallant, N.D. (2014). Crosslinking effect on polydimethylsiloxane elastic modulus measured by custom-built compression instrument. *Journal of Applied Polymer Science* 131, n/a-n/a.

Weibel, D.B., DiLuzio, W.R., and Whitesides, G.M. (2007). Microfabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology* 5, 209–218.

Westman, J., Hube, B., and Fairn, G.D. (2019). Integrity under stress: Host membrane remodelling and damage by fungal pathogens. *Cellular Microbiology* 21, e13016.

Xia, Y., and Whitesides, G.M. (1998). Soft lithography. *Annual Review of Materials Science* 28, 153–184.

Xie, J., Zhang, Q., Zhu, T., Zhang, Y., Liu, B., Xu, J., and Zhao, H. (2014). Substrate stiffness-regulated matrix metalloproteinase output in myocardial cells and cardiac fibroblasts: Implications for myocardial fibrosis. *Acta Biomaterialia* 10, 2463–2472.

Yeoh, O.H. (1997). On the Ogden strain-energy function. *Rubber Chemistry and Technology* 70, 175–182.

Zheng, Y., Crosby, A.J., and Cai, S. (2017). Indentation of a stretched elastomer. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 107, 145–159.

Annexes

1. Viscoélasticité

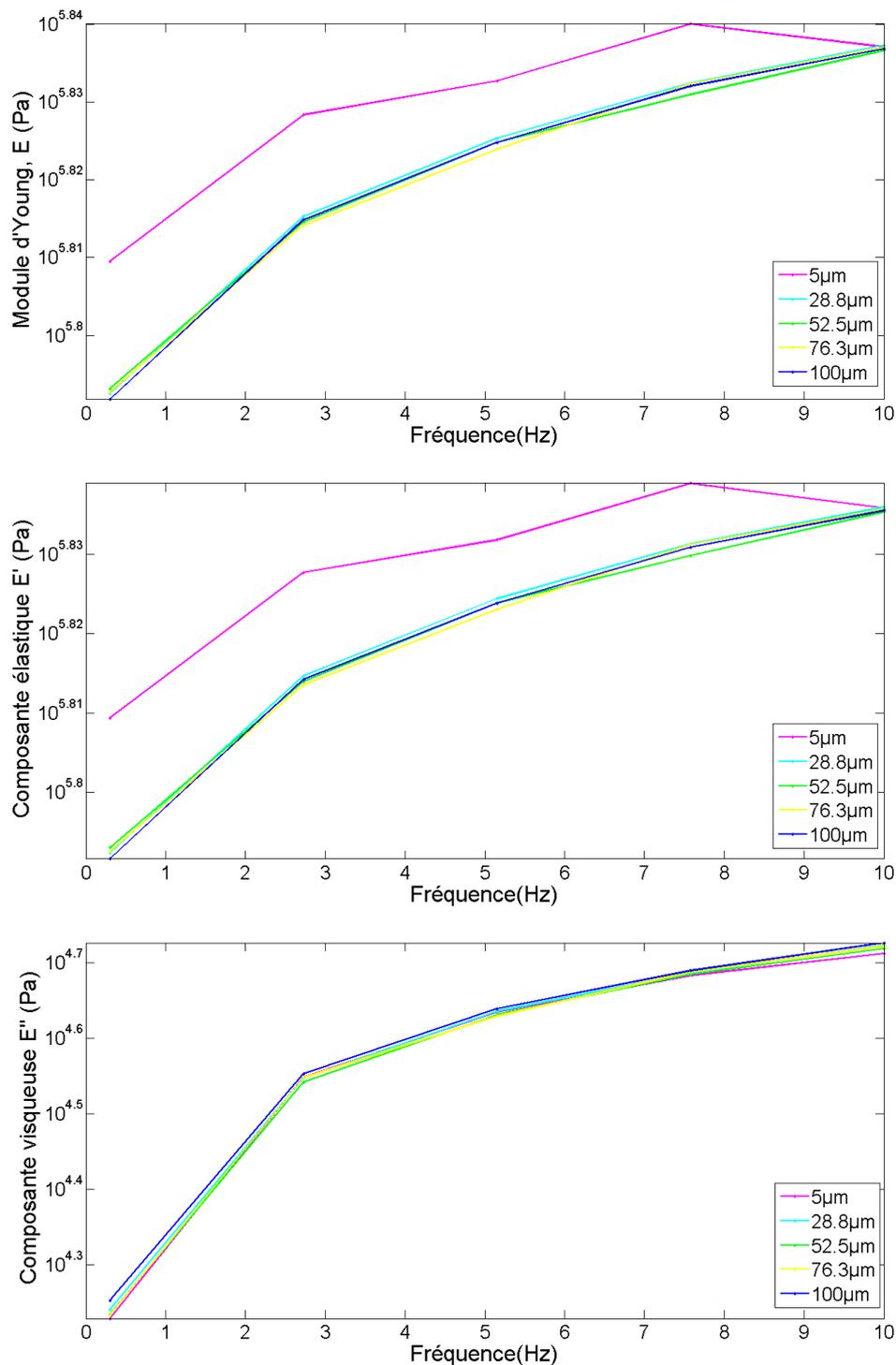


Figure 0.1 Analyse mécanique dynamique de PDMS 5:1

A) Module d'Young B) La composante élastique C) La composante visqueuse en fonction de la fréquence d'oscillation avec les différentes amplitudes (courbes en couleurs).

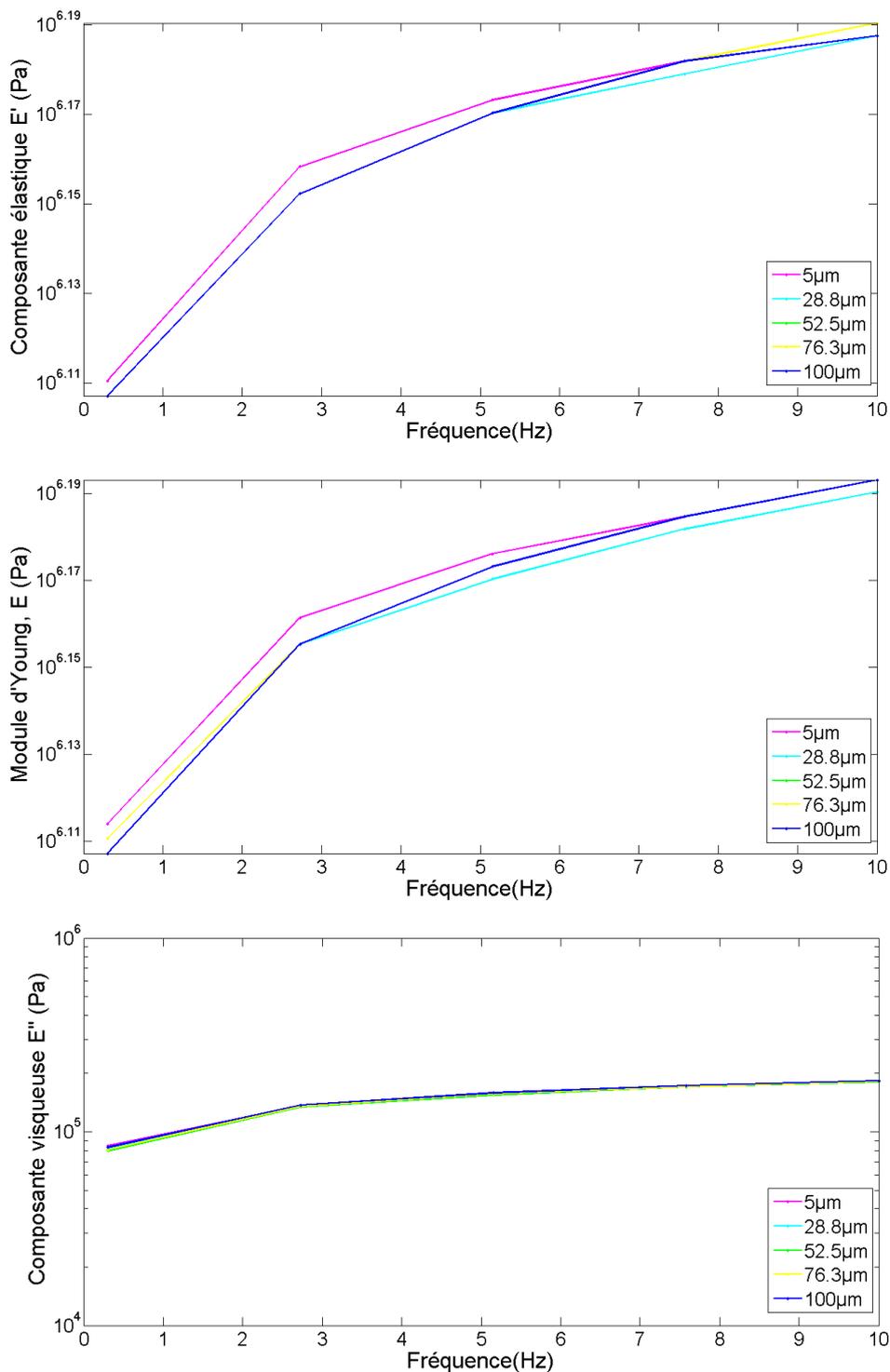


Figure 0.2 Analyse mécanique dynamique de PDMS 10:1

A) Module d'Young B) La composante élastique C) La composante visqueuse en fonction de la fréquence d'oscillation avec les différentes amplitudes (courbes en couleurs).

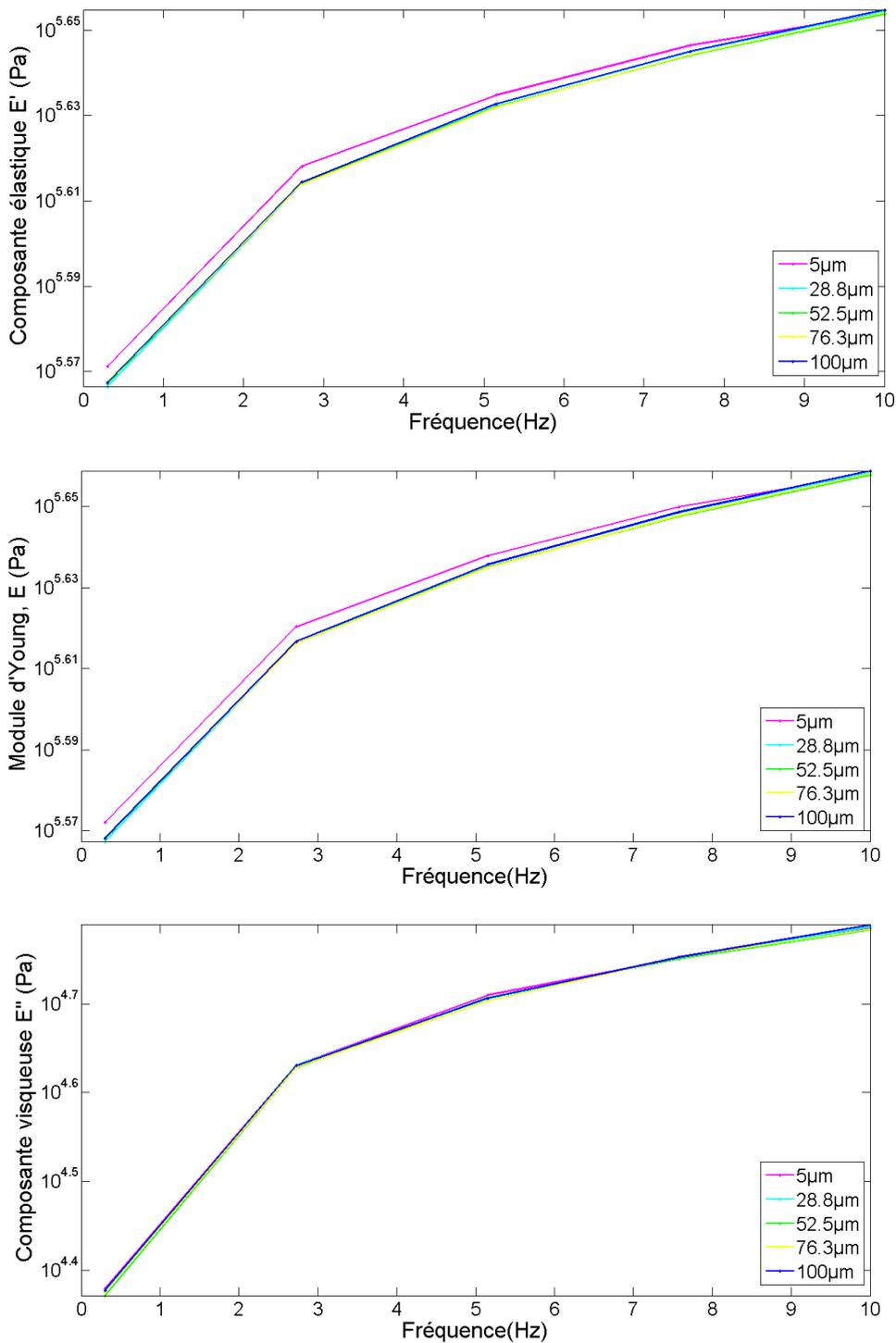


Figure 0.3 Analyse mécanique dynamique de PDMS 20:1

A) Module d'Young B) La composante élastique C) La composante visqueuse en fonction de la fréquence d'oscillation avec les différentes amplitudes (courbes en couleurs).

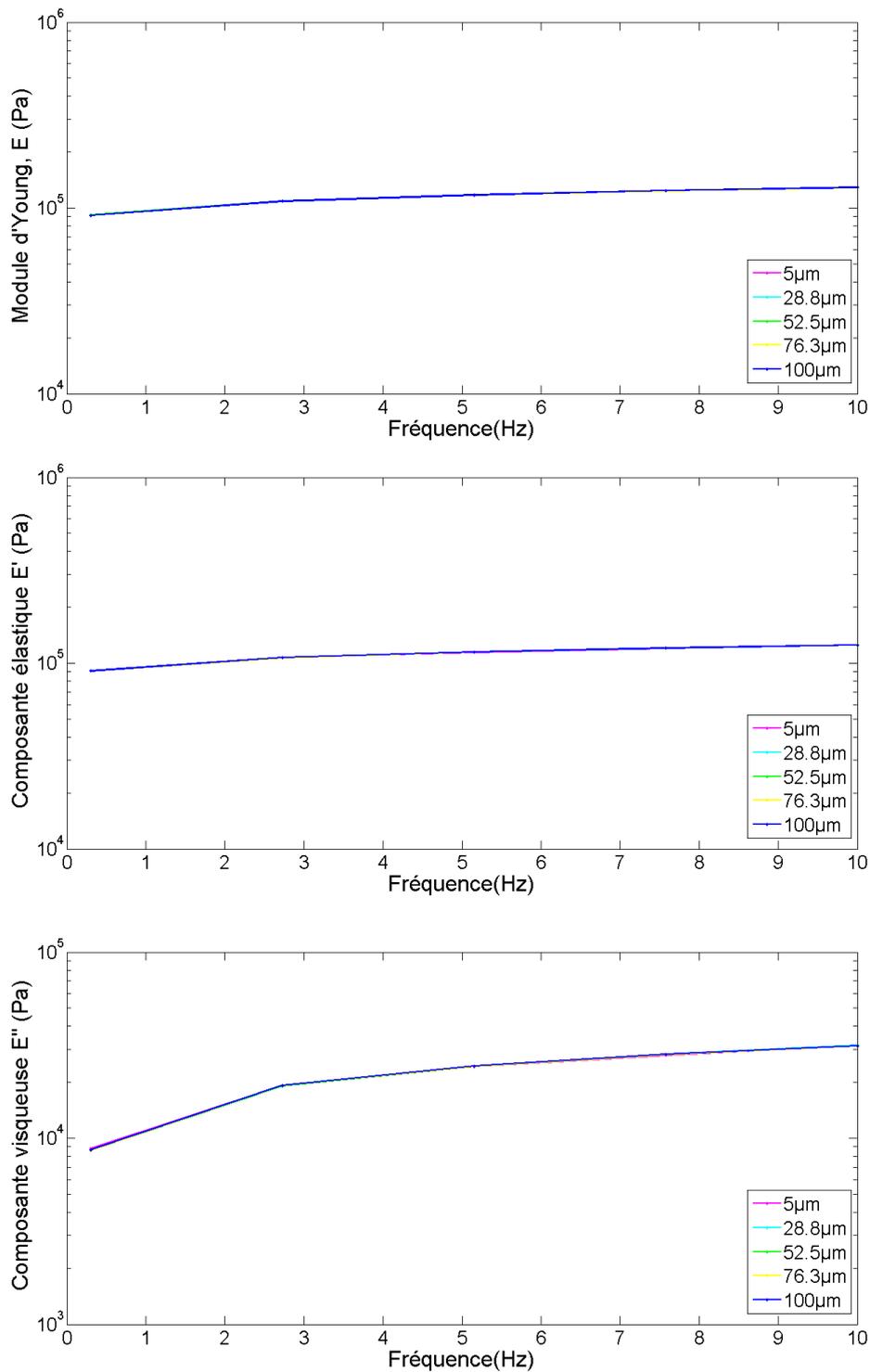


Figure 0.4 Analyse mécanique dynamique de PDMS 30:1

A) Module d'Young B) La composante élastique C) La composante visqueuse en fonction de la fréquence d'oscillation avec les différentes amplitudes (courbes en couleurs).

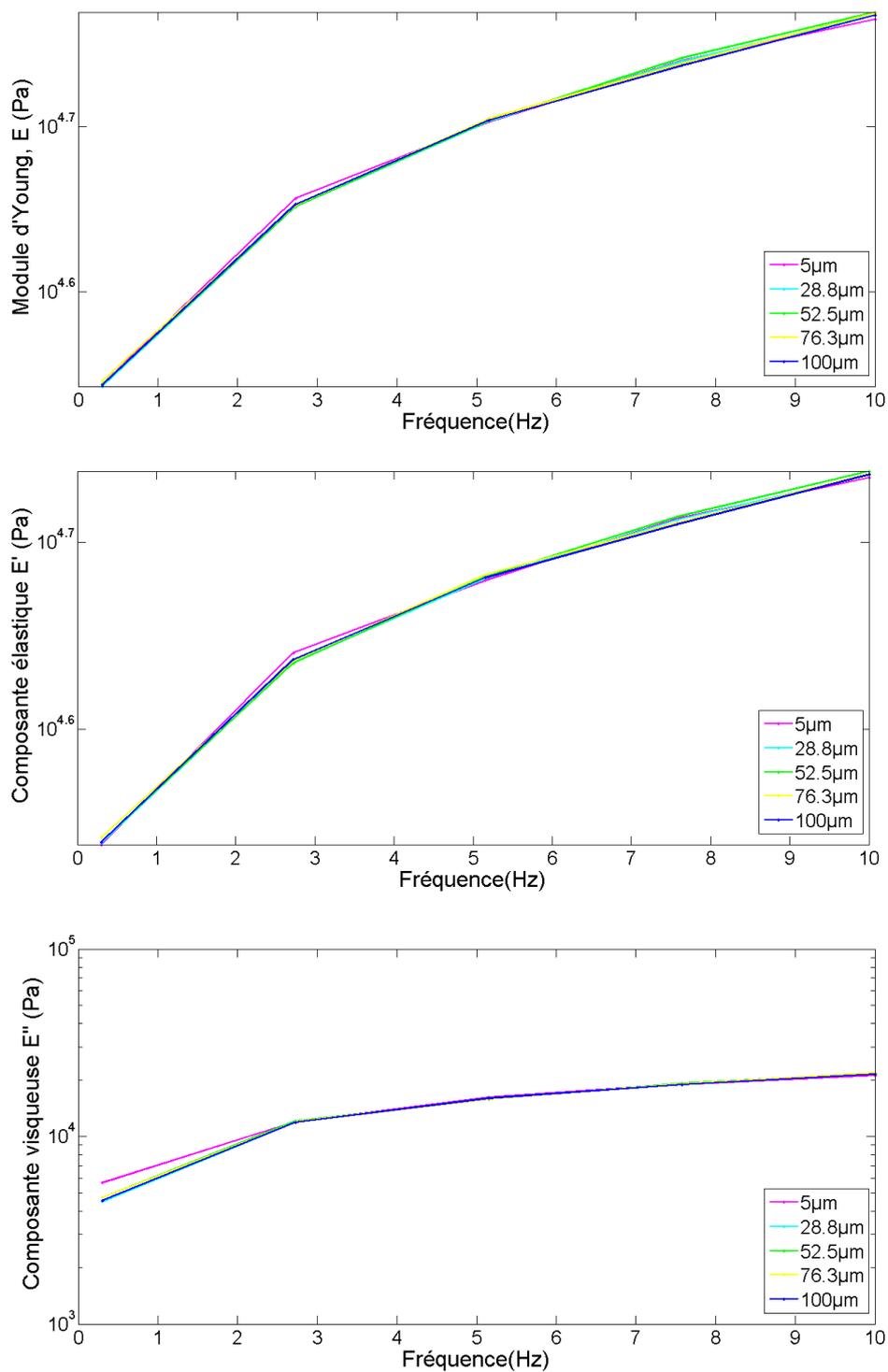


Figure 0.5 Analyse mécanique dynamique de PDMS 40:1

A) Module d'Young B) La composante élastique C) La composante visqueuse en fonction de la fréquence d'oscillation avec les différentes amplitudes (courbes en couleurs).

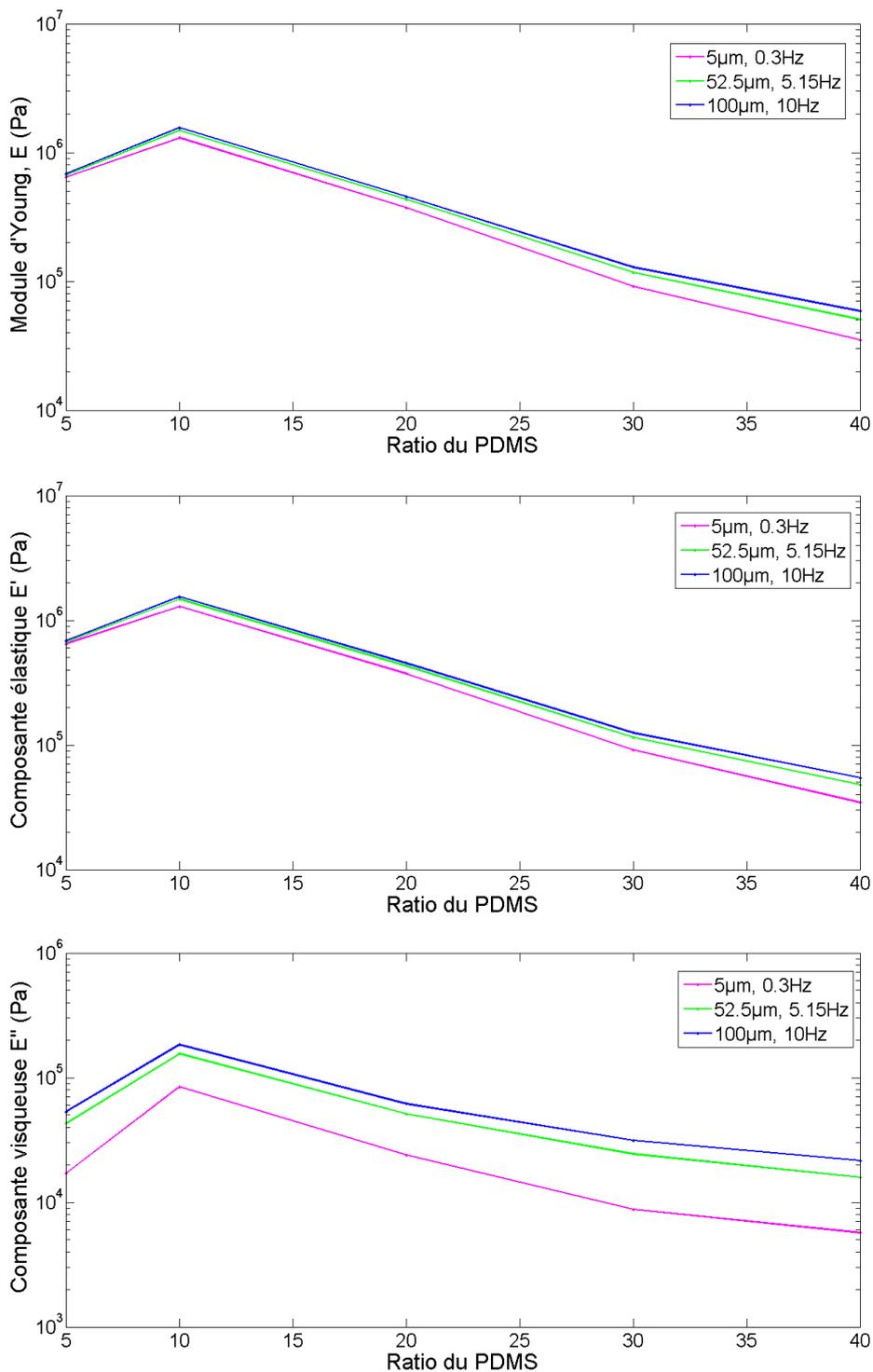


Figure 0.6 Analyse mécanique dynamique de PDMS

A) Module d'Young B) La composante élastique C) La composante visqueuse en fonction de la fréquence d'oscillation avec les différentes amplitudes (courbes en couleurs).

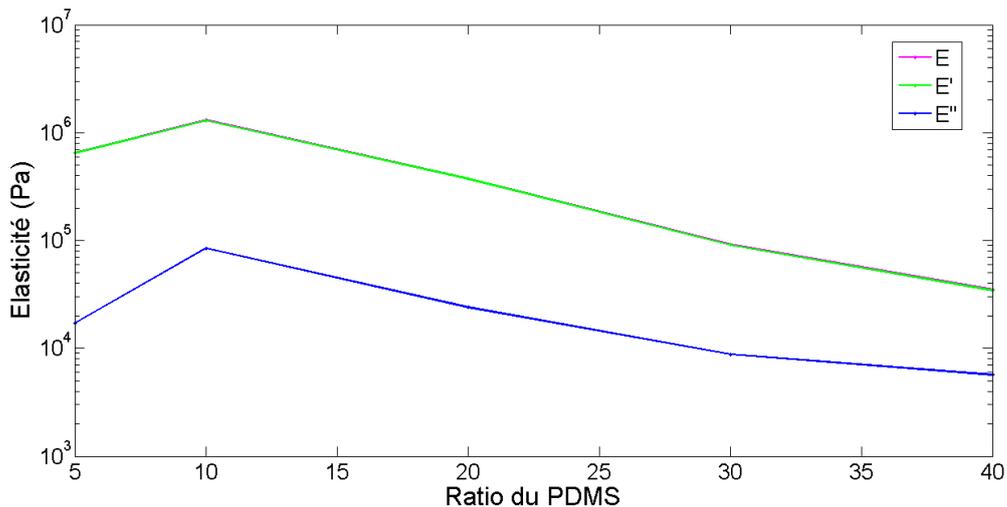


Figure 0.7 Analyse mécanique dynamique à 0.3 Hz avec 5 μm d'amplitude

En magenta le module d'Young, en vert la composante élastique, en bleu la composante visqueuse en fonction du ratio de PDMS.

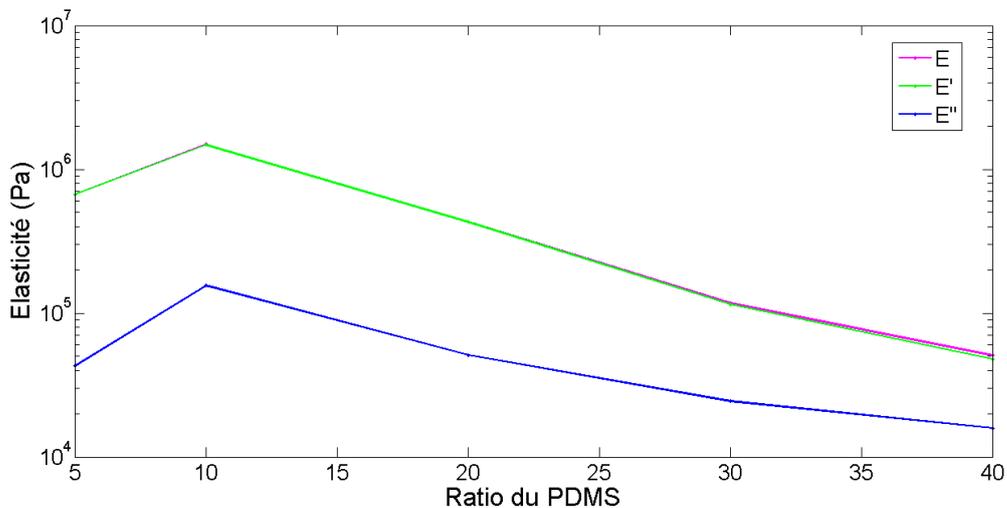


Figure 0.8 Analyse mécanique dynamique à 5.15 Hz avec 52.5 μm d'amplitude

En magenta le module d'Young, en vert la composante élastique, en bleu la composante visqueuse en fonction du ratio de PDMS.

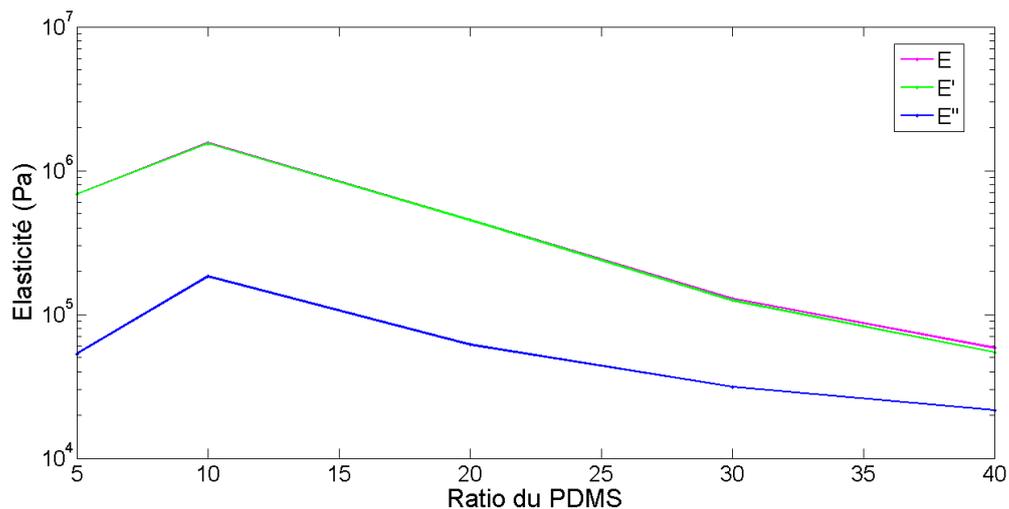


Figure 0.9 Analyse mécanique dynamique à 10 Hz avec 100 μm d'amplitude

En magenta le module d'Young, en vert la composante élastique, en bleu la composante visqueuse en fonction du ratio de PDMS.

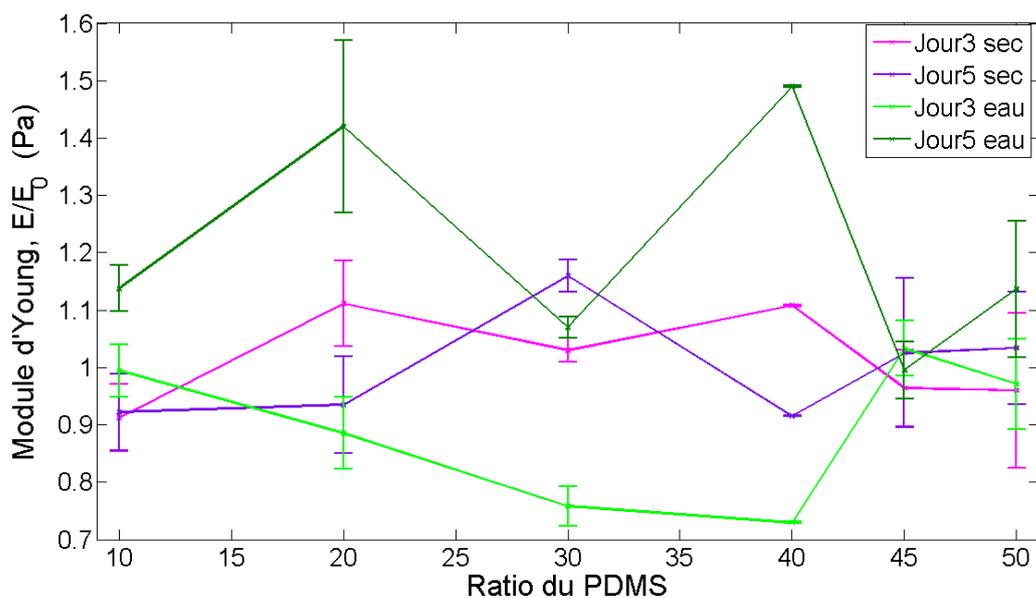


Figure 0.10 L'effet du vieillissement et de la diffusion de l'eau sur le module d'Young de PDMS

En magenta la mesure 3 jours après la fabrication de l'échantillon, en violet la mesure 5 jours après. En vert, la mesure 3 jours après la fabrication de l'échantillon et mise dans l'eau pure, en vert foncé la mesure 5 jours après. Toutes les mesures ont été normalisées par la mesure initiale (le jour de la fabrication de l'échantillon, E_0). Les barres d'erreur sont les écarts-types de module d'Young mesuré plusieurs fois sur le même échantillon.

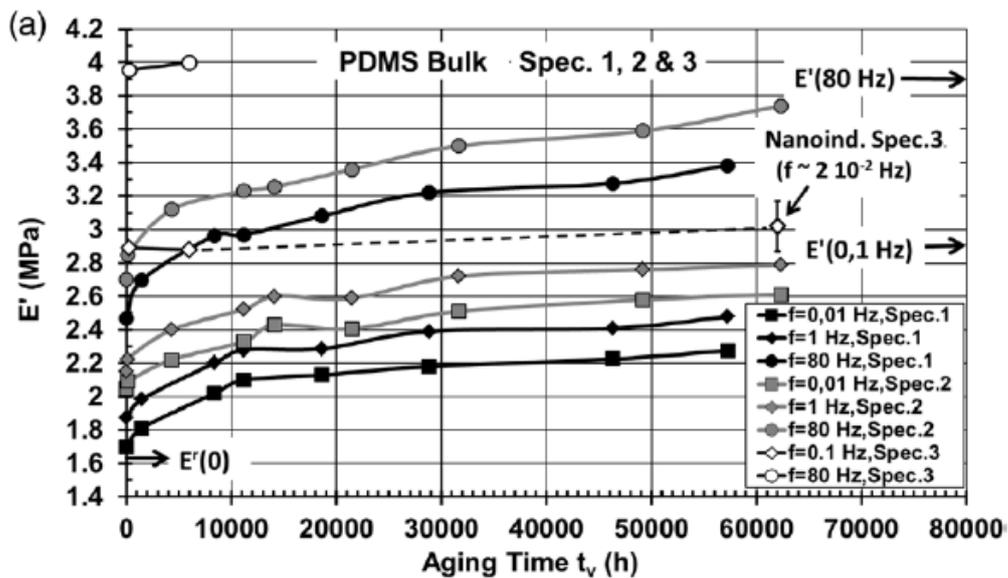


Figure 0.11 Module de stockage en fonction du temps de vieillissement pour le PDMS 10:1 (Placet et Delobelle, 2015)

2. Indentation

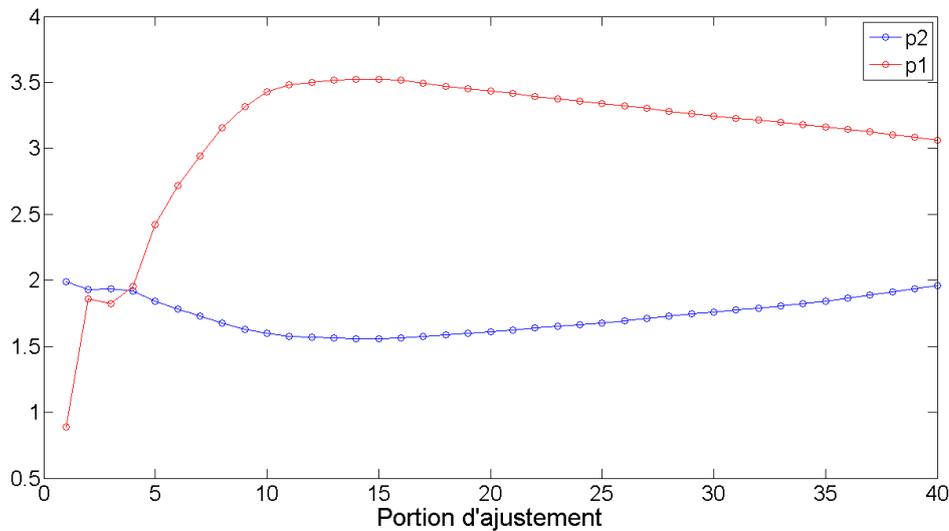


Figure 0.12 Les coefficient d'ajustement de la courbe d'indentation dans le PDMS de ratio 30 :1 $r_{max}=R$

Les coefficients de l'ajustement ($f(x) = p1*x^2 + p2*x + p3$), en bleu le terme linéaire ($p2$), en rouge le terme quadratique (p), en fonction de la portion de la courbe d'indentation ajusté, 40 étant la totalité de la courbe (c'est-à-dire jusqu'à la rupture).

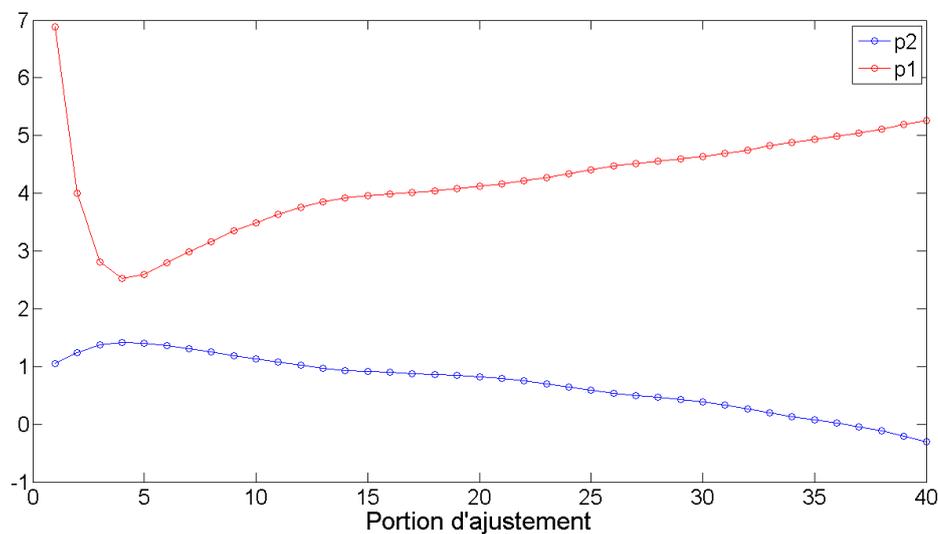


Figure 0.13 Les coefficient d'ajustement de la courbe d'indentation dans le PDMS 30 :1 $x_{max}=L$

Les coefficients de l'ajustement ($f(x) = p1*x^2 + p2*x + p3$), en bleu le terme linéaire ($p2$), en rouge le terme quadratique (p), en fonction de la portion de la courbe d'indentation ajusté, 40 étant la totalité de la courbe (c'est-à-dire jusqu'à la rupture).

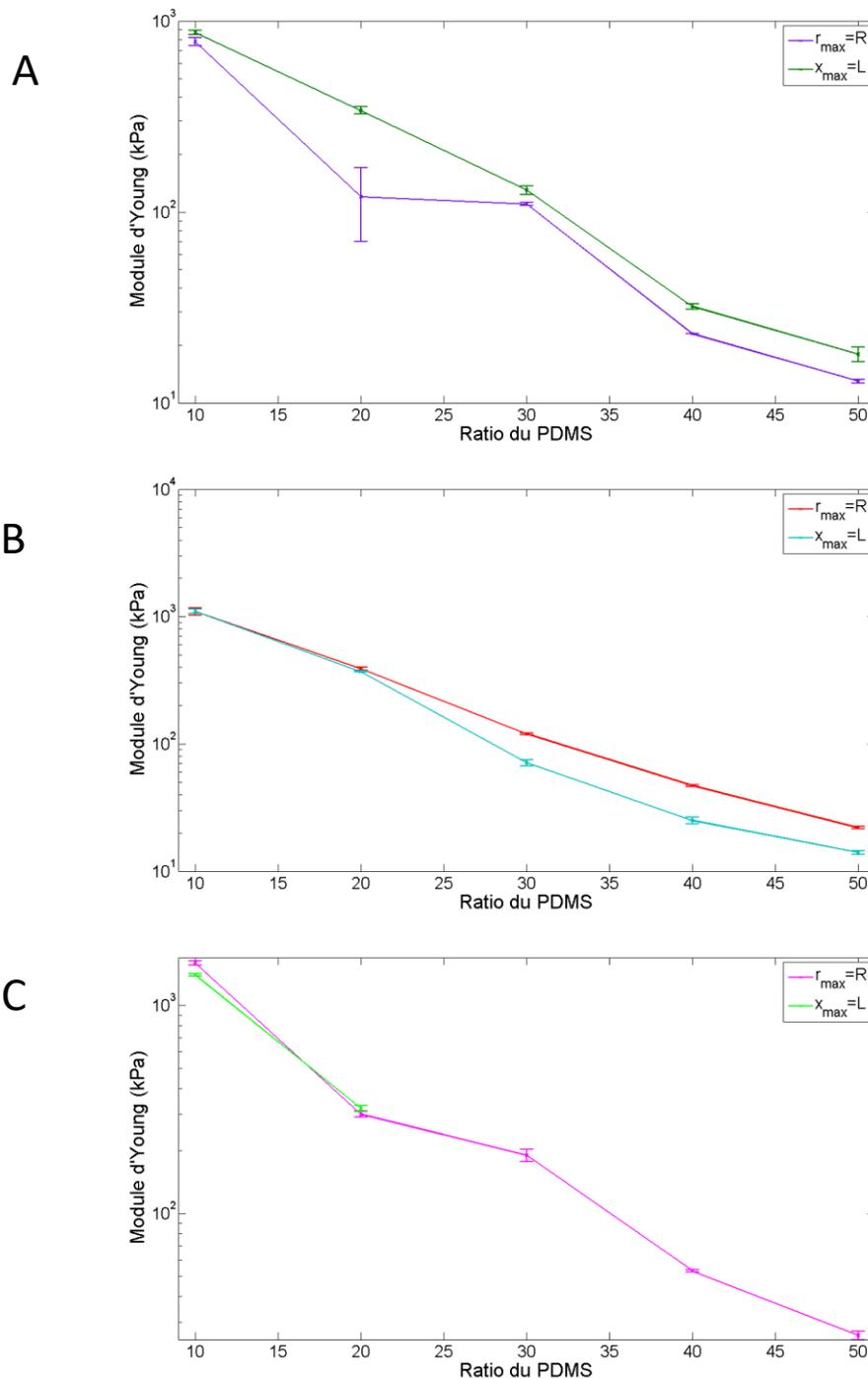


Figure 0.14 Module d'Young de PDMS $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$

Les sondes en acier ont indenté des échantillons cylindriques $r_{max}=R$ et dans les échantillons cylindriques $x_{max}=L$ de différent ratio de PDMS, et le module d'Young a été donné par le modèle néohookéen de Fakhouri et al. $F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' E R d$ (1.40). Chaque point correspond à une moyenne de 5 valeurs de coefficients issues des ajustement effectués sur A) un quart de la courbe (5 :10) B) la moitié de la courbe (20 :25) C) la courbe jusqu'à la rupture (35 :40), pour chaque ratio indenté à $3\mu\text{m/s}$, les barres d'erreur sont les écart-types.

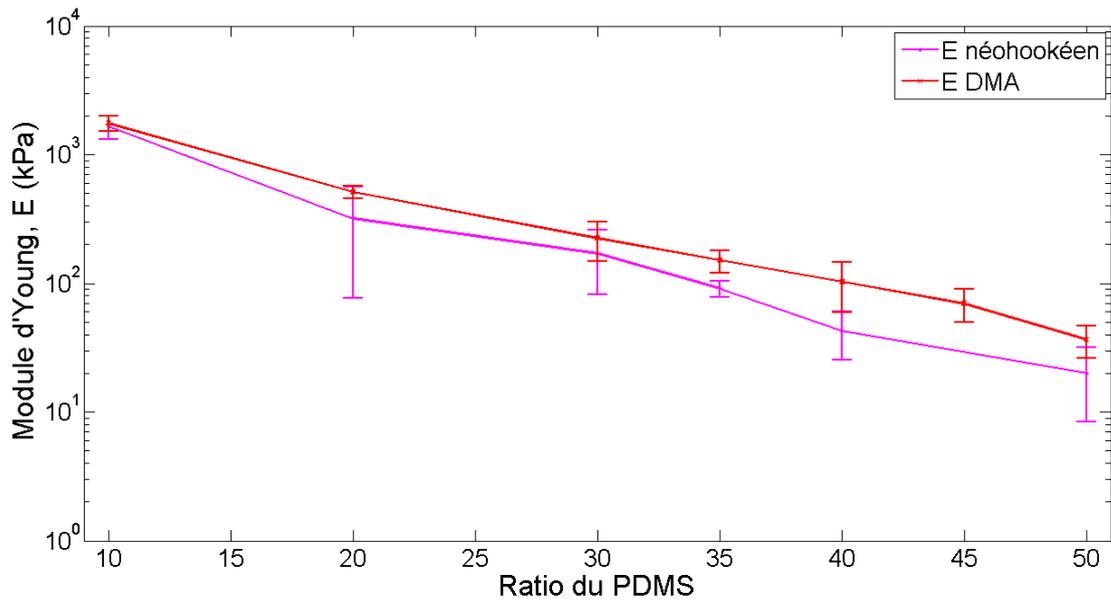


Figure 0.15 Comparaison de modules d'Young issues d'une analyse mécanique dynamique et de modèle néohookéen de Fakhouri et al., de l'indentation

En magenta Le module d'Young calculé à partir des ajustements de modèle néohookéen $F = -\sigma_z R^2 = k' E d^2 + k'' E R d$ (1.40) des courbes d'indentation, en rouge le module d'Young mesuré avec l'analyse dynamique mécanique, en fonction du ratio de PDMS.

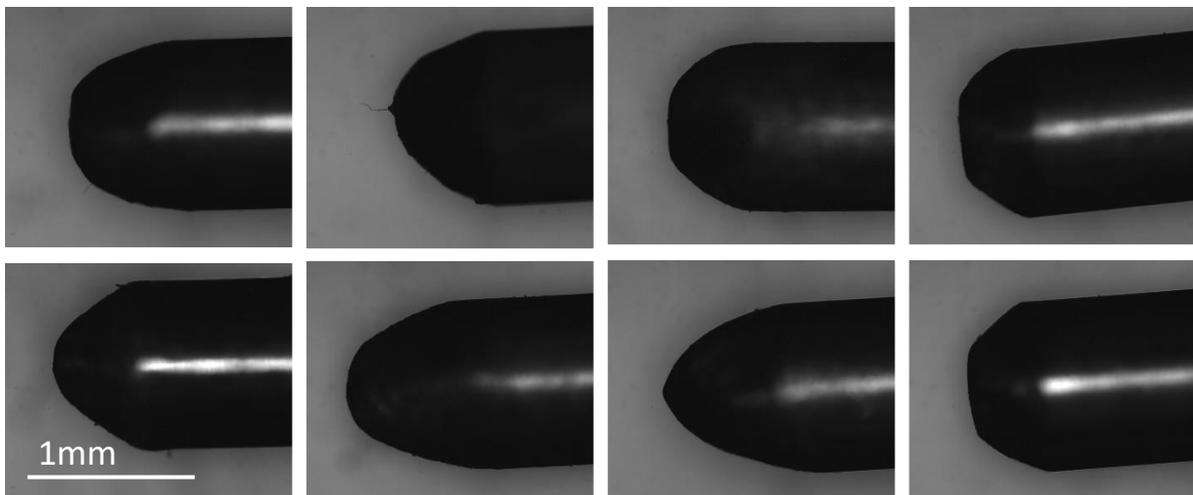


Figure 0.16 Pointes des sondes en acier

Les images ont été prises par une microscopie à transmission, avec l'objectif 5x.

3. Perforation

Conditions aux bords

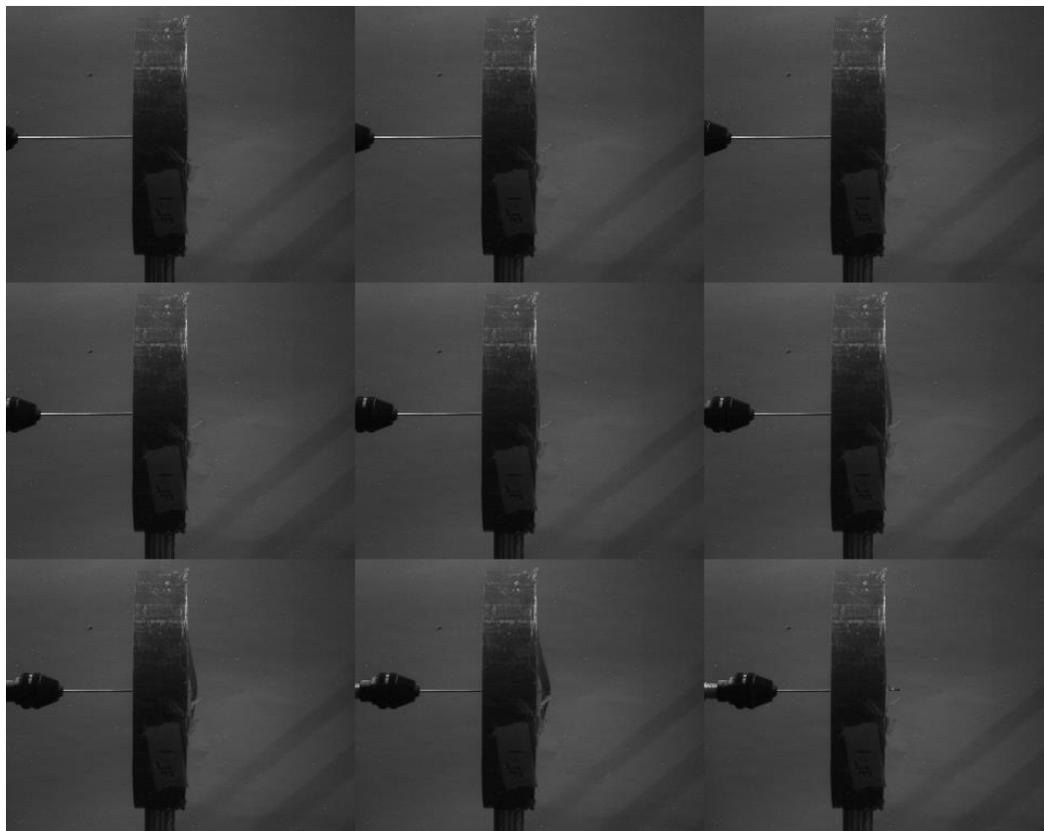
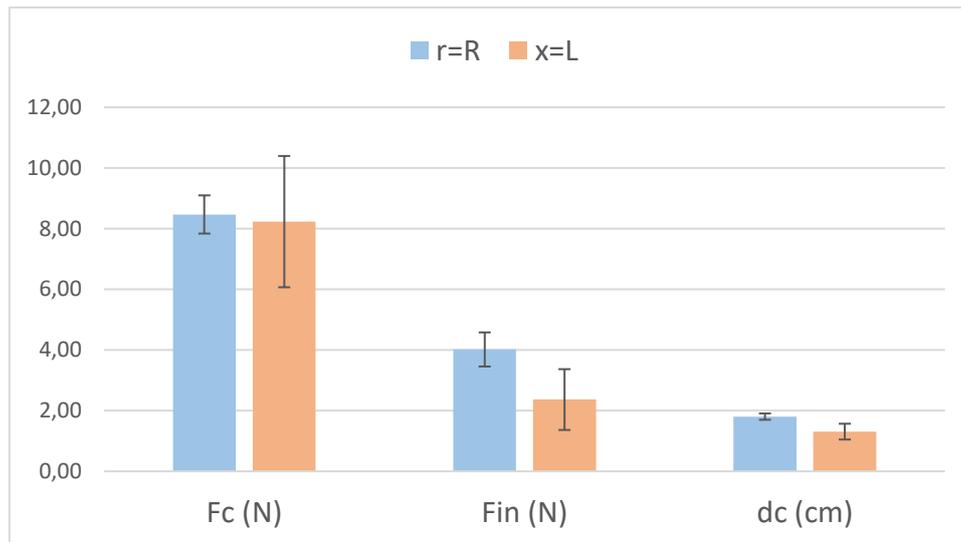


Figure 0.17 La dire déformation de la paroi opposée de l'échantillon de PDMS lors d'indentation en conditions aux bords $r_{max}=R$

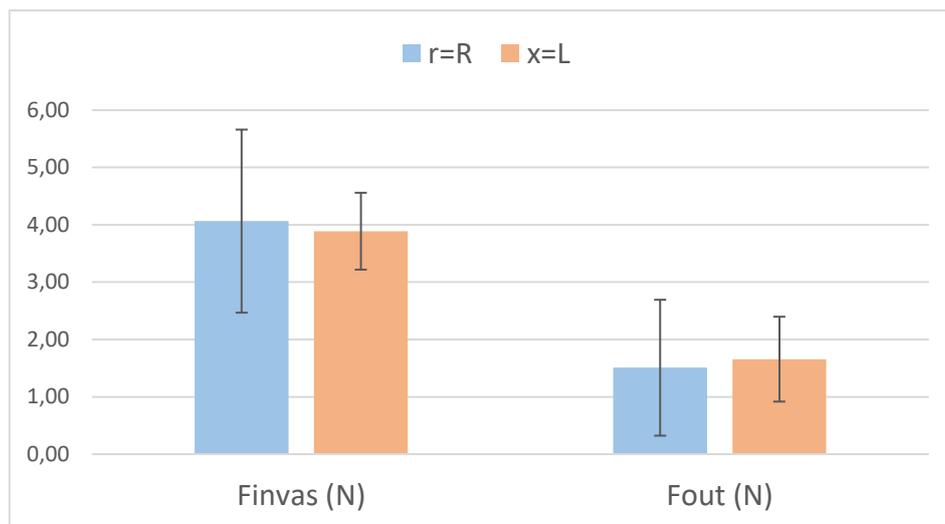
Indentation de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse $3 \mu\text{m/s}$ dans le PDMS 35:1, 8cm de diamètre, 2cm de longueur au conditions de bord $r_{max}=R$. L'échantillon de PDMS a été réticulé 1h à 60°C puis 2h à 90°C . Les images ont été prise par une caméra Pixelink.



30:1

Figure 0.18 F_{in} et d_{crit} pour des conditions aux bords $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, de PDMS 30:1

Perforation des cylindres de PDMS 30 :1 avec les conditions aux bords $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $30\mu\text{m/s}$. Chaque histogramme de d_{crit} , F_{crit} et F_{in} déterminé par huit différentes sondes, sur les cylindres ($3,5\text{cm} \times 1.75\text{cm}$ et $8\text{cm} \times 2\text{cm}$), représente la valeur moyenne de 5 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.



30:1

Figure 0.19 F_{invas} et F_{out} pour des conditions aux bords $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, de PDMS 30:1

Perforation des cylindres de PDMS 30:1 avec les conditions aux bords $r_{max}=R$ et $x_{max}=L$, avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $30\mu\text{m/s}$ dans les. Chaque histogramme de F_{invas} et F_{out} déterminé par huit différentes sondes, sur les cylindres ($3,5\text{cm} \times 1.75\text{cm}$ et $8\text{cm} \times 2\text{cm}$), représente la valeur moyenne de 5 mesures, et la barre d'erreur est l'écart-type correspondant.

Variation de la vitesse

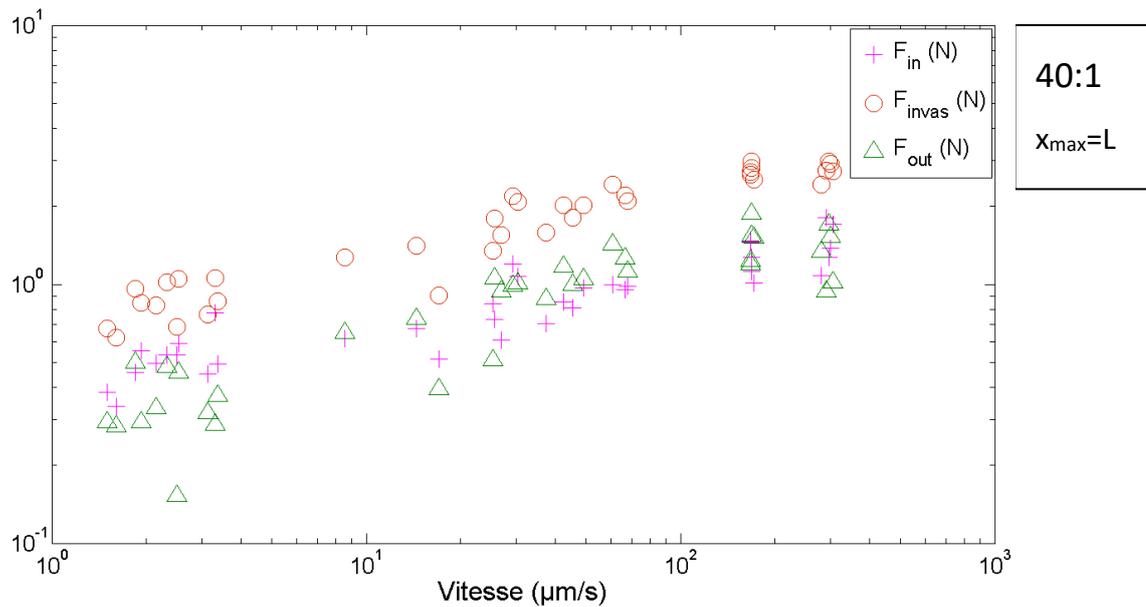


Figure 0.20 F_{invas} , F_{out} et F_{in} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 40:1
 $x_{max}=L$

Perforation des cylindres de PDMS 40:1 avec les conditions aux bords $x_{max}=L$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $300\mu\text{m/s}$. Chaque point représente une mesure.

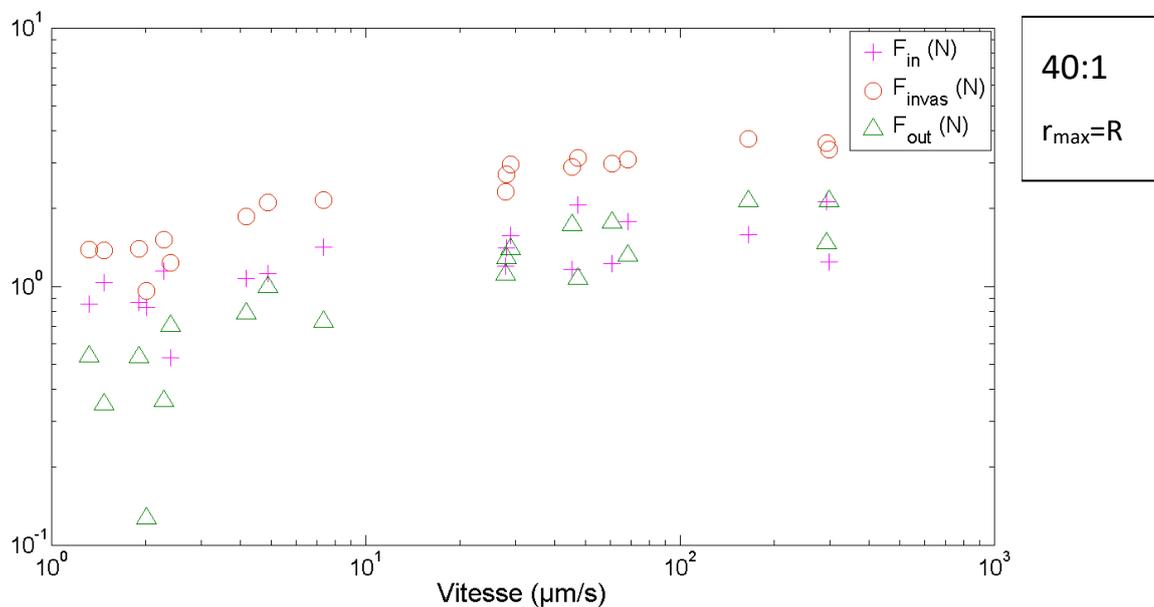


Figure 0.21 F_{invas} , F_{out} et F_{in} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 40:1
 $r_{max}=R$

Perforation des cylindres de PDMS 40:1 avec les conditions aux bords $r_{max}=R$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $300\mu\text{m/s}$. Chaque point représente une mesure.

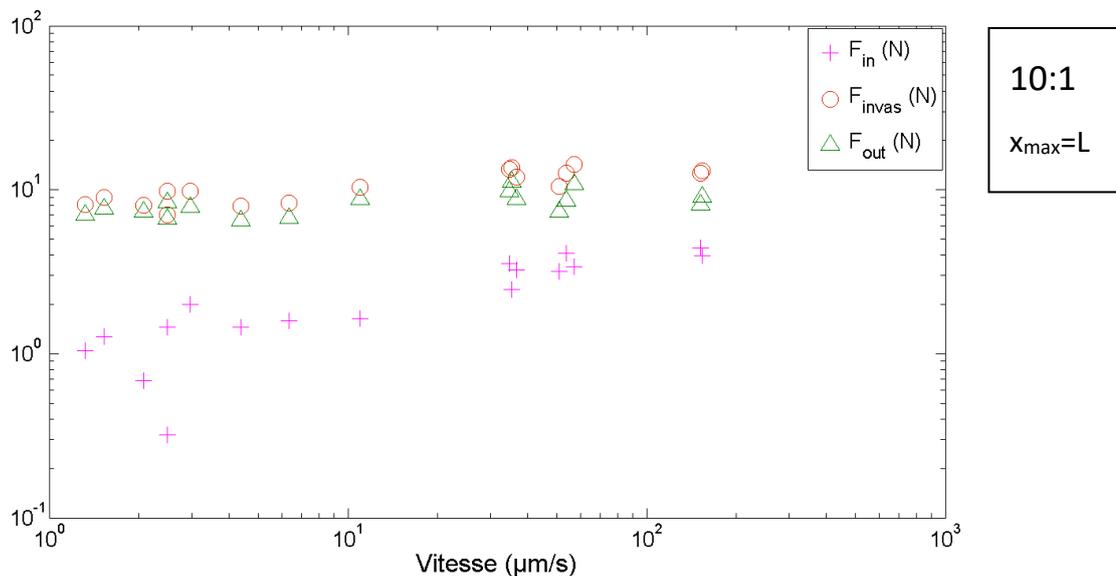


Figure 0.22 F_{invas} , F_{out} et F_{in} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 10:1 $x_{max}=L$

Perforation des cylindres de PDMS 10:1 avec les conditions aux bords $x_{max}=L$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $160\mu\text{m/s}$. Chaque point représente une mesure.

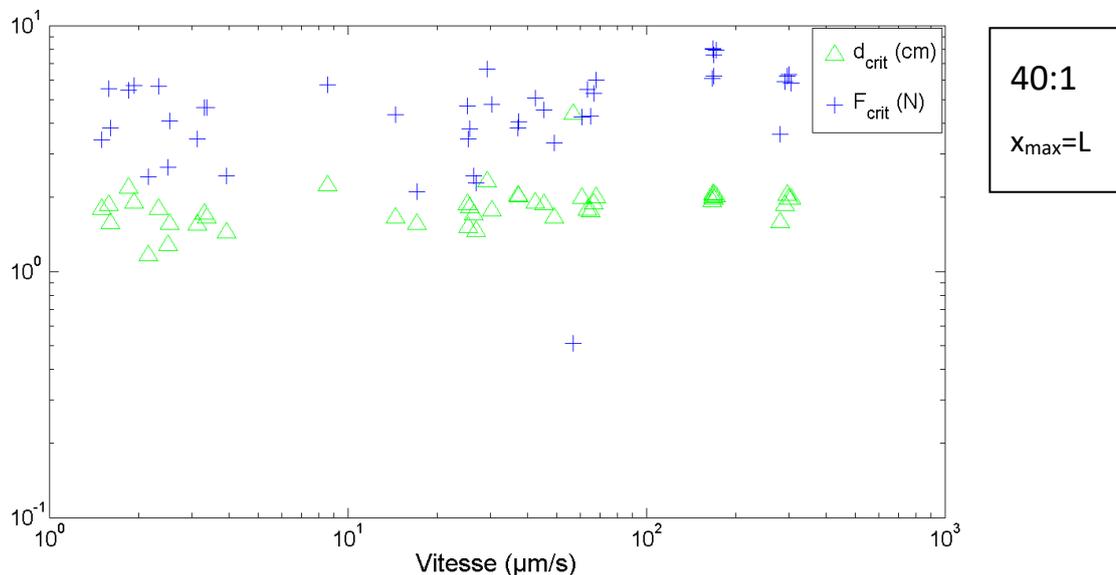


Figure 0.23 d_{crit} et F_{crit} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 40:1 $x_{max}=L$

Perforation des cylindres de PDMS 40 :1 avec les conditions aux bords $x_{max}=L$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $300\mu\text{m/s}$. Chaque point représente une mesure.

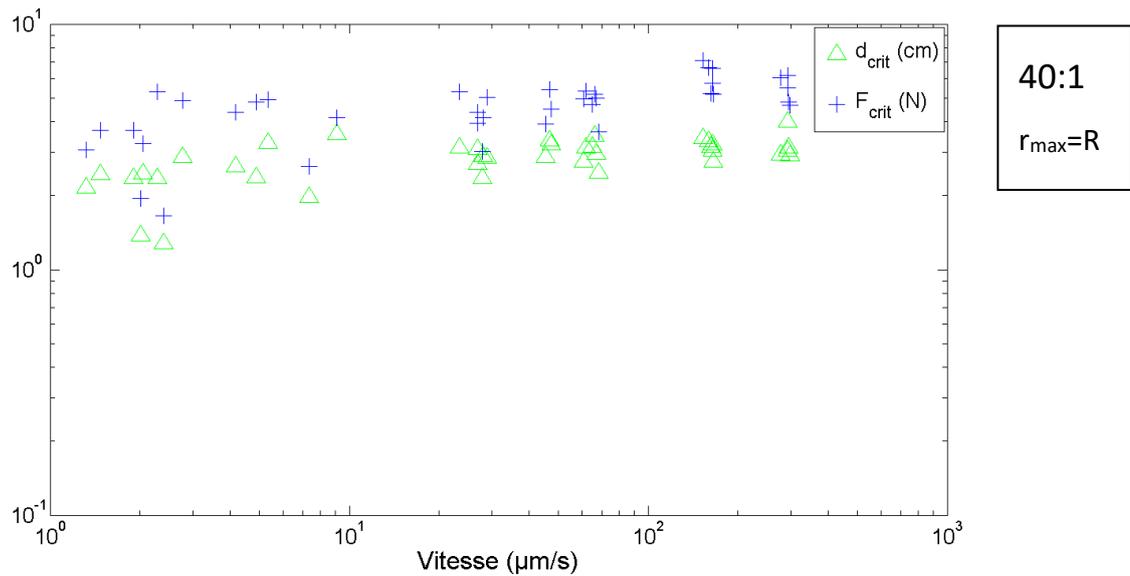


Figure 0.24 d_{crit} et F_{crit} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 40:1 $r_{max}=R$

Perforation des cylindres de PDMS 40 :1 avec les conditions aux bords $r_{max}=R$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $300\mu\text{m/s}$. Chaque point représente une mesure.

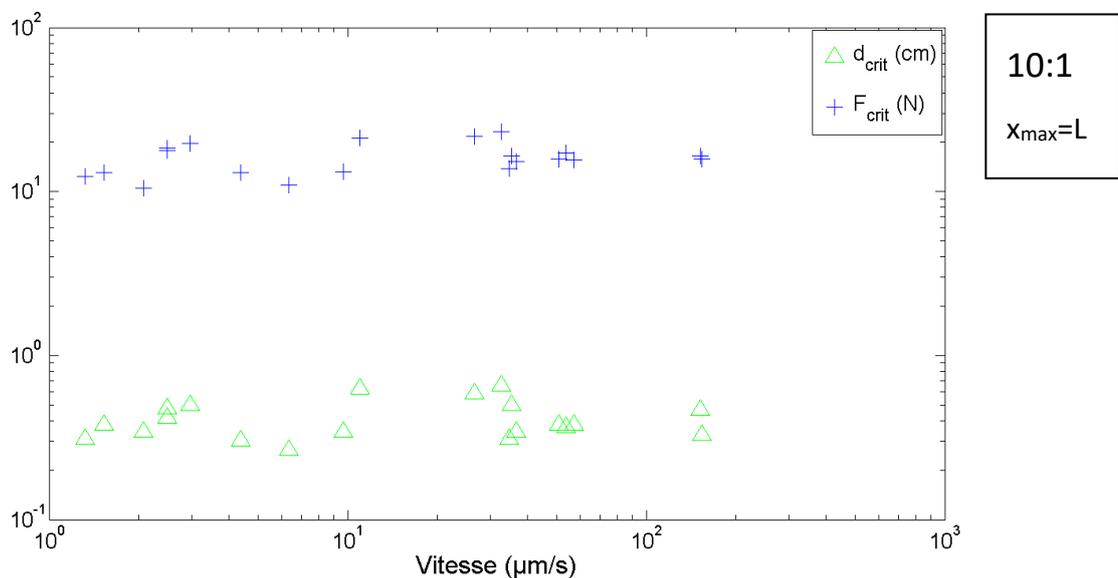


Figure 0.25 d_{crit} et F_{crit} en fonction de la vitesse de perforation dans un cylindre de PDMS 10:1 $x_{max}=L$.

Perforation des cylindres de PDMS 10 :1 avec les conditions aux bords $x_{max}=L$, avec de la sonde en acier de 1mm de diamètre avec une vitesse ente $3 \mu\text{m/s}$ et $160\mu\text{m/s}$. Chaque point représente une mesure.

4. *Candida albicans*

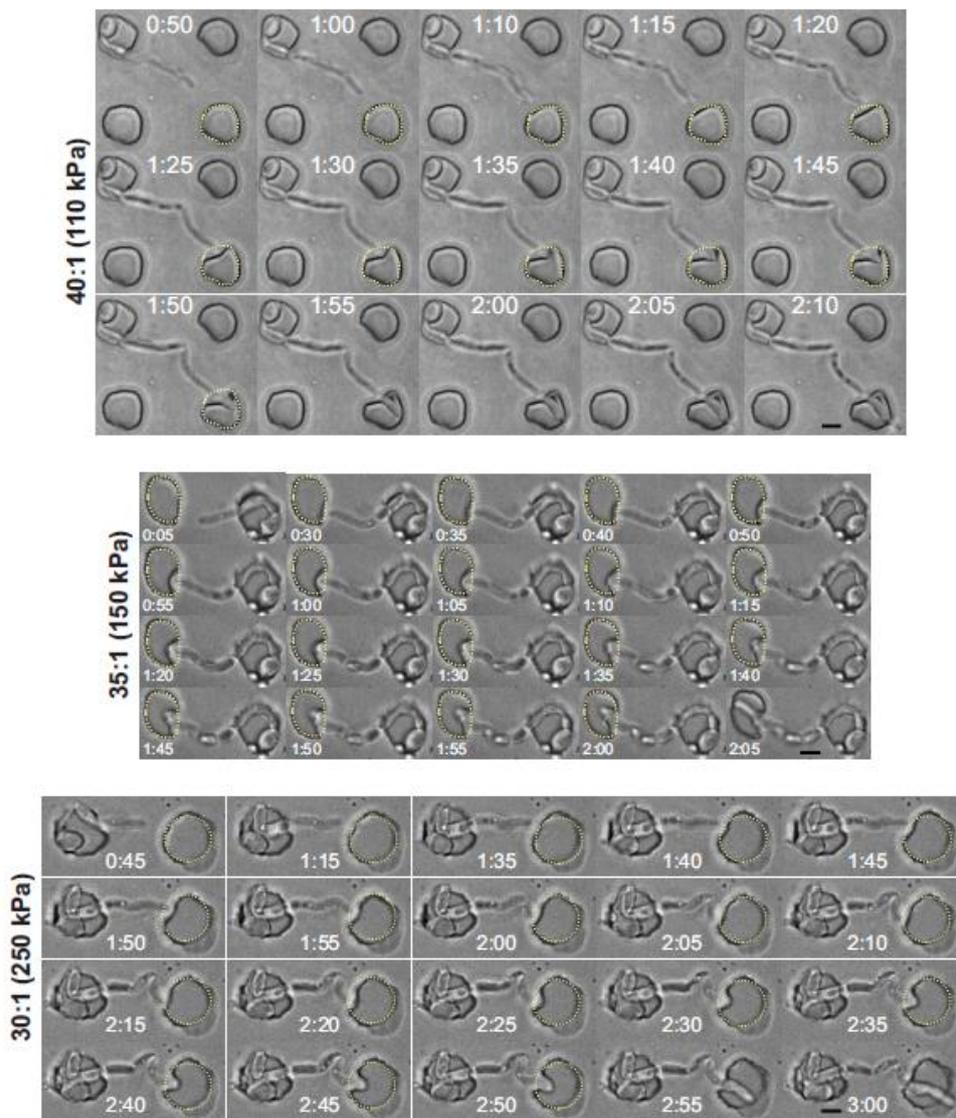


Figure 0.26 Croissance invasive et pénétration dans le puits adjacent de substrats de rigidités différentes

Expériences de suivi en temps réel des cellules en DIC au ratio de PDMS indiqué. Le puits adjacent est montré avec une ligne jaune en pointillé et la déformation de ce puits a duré environ 40 min dans le PDMS 40: 1 et 80-90 min pour les deux substrats plus rigides.

Biophysique de la croissance filamenteuse fongique et mécanique de perforation dans des élastomères / Biophysics of fungal filamentous growth and mechanics of perforation in elastomers by Nino Kukhaleishvili is licensed under [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

