HAL
open science

Candida albicans sur puce microfluidique : réponse des hyphes aux contraintes physiques et cycle cellulaire

Elodie Couttenier

To cite this version:

Elodie Couttenier. Candida albicans sur puce microfluidique : réponse des hyphes aux contraintes physiques et cycle cellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paris sciences et lettres, 2020. Français. NNT : 2020UPSLS032 . tel-03227426

HAL Id: tel-03227426

https://theses.hal.science/tel-03227426v1

Submitted on 17 May 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.

PSL UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Institut Curie

Candida albicans sur puce microfluidique : réponse des hyphes aux contraintes physiques et cycle cellulaire

Soutenue par

Elodie COUTTENIER

Le 4 décembre 2020

École doctorale n°564

Physique en Île-de-France

Spécialité

Physique

Composition du jury :

Jean-François JOANNY Professeur, Collège de France	*Président*
Robert ARKOWITZ DR, Université Côte d'Azur - CNRS	*Rapporteur*
Olivier HAMANT DR, ENS Lyon - INRAE	*Rapporteur*
Lydia ROBERT CR, Sorbonne Université - INRAE	*Examinatrice*
Christophe d'ENFERT Directeur scientifique, Institut Pasteur	*Co-directeur de thèse*
Catherine VILLARD DR, Institut Curie - CNRS	*Directrice de thèse*

institutCurie

REMERCIEMENTS

Cette thèse représente un peu plus de 3 années de travail, des années au cours desquelles j'ai pu rencontrer et côtoyer des personnes formidables qui ont rendu ce travail possible ! Je voudrais ici remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette thèse.

Je voudrais commencer par remercier énormément mes encadrants : Catherine, Christophe et Sophie. Après le stage de M2, ils m'ont fait confiance et ont accepté de poursuivre avec moi cette aventure en thèse et nous voilà 3 ans plus tard ! Merci à tous les trois pour votre accompagnement tout au long de ma thèse, et aussi de m'avoir laissée une grande liberté tout en étant présent lorsque nécessaire, et d'avoir partager avec moi nos découvertes, toujours plus étonnantes les unes que les autres ! Merci à Christophe et Sophie pour m'avoir accompagnée dans la compréhension de la biologie de cet organisme mystérieux qu'est *C. albicans*. Merci pour nos discussions toujours riches en informations et en particulier un grand merci à Sophie qui m'a aussi accompagnée à la paillasse et a répondu avec bienveillance à mes multiples questions au fil de ces années ! Merci beaucoup à Catherine d'avoir partagée avec moi cet enthousiasme pour l'interdisciplinarité avec les aspects physiques et technologiques mais aussi le côté biologique et le monde des champignons que nous avons découvert ensemble. Merci à elle d'avoir toujours su se rendre disponible lorsque j'en avais besoin, et d'avoir été à l'écoute de mes questionnements et doutes.

Merci aussi à tous les membres de mon jury de thèse, mes rapporteurs Robert Arkowitz et Olivier Hamant ainsi que Lydia Robert et Jean-François Joanny d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci pour leur lecture attentive de mon manuscrit ainsi que pour la discussion très intéressante que nous avons pu avoir.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Nicolas Minc et Stéphanie Mangenot, d'avoir accepté de discuter et suivre mon projet.

Je souhaite également remercier Alexandra Brand, Judith Berman et Robert Arkowitz pour avoir accepté de nous donner certaines de leurs souches qui nous ont été bien utiles.

Merci aux personnes qui ont partagé un peu mon quotidien au labo en travaillant sur ce champignon : Eva et Godelive que j'ai pu encadrées en stage, mais aussi Sara et Temple pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci aussi à Lucie, même si nous n'avons pas eu l'occasion de se côtoyer au labo, c'est toujours un plaisir de discuter de nos problématiques assez proches. Merci également à Morgan, pour toutes nos discussions très intéressantes et son regard éclairé sur nos résultats !

Je souhaite également remercier Jean-Louis et Stéphanie qui m'ont accueillie dans leur équipe. C'est dans cette fabuleuse équipe MMBM que j'ai pu évoluer pendant toutes ces années, et rencontrer de nouveaux amis. Un grand merci en particulier à mes camarades de bureau qui ont grandement contribué à ce cadre de travail particulièrement agréable : Audric et Simon, avec qui j'ai partagé avec plaisir cette expérience de thèse depuis notre stage de M2 jusqu'à la soutenance, et aussi Mathilde, qui nous suit de près dans cette aventure, et Terence qui sont tous deux toujours partants pour un goûter. Merci à l'ensemble des membres de l'équipe pour leur aide, leur soutien, les discussions que l'on a pu avoir, scientifiques ou non : Charles, Giacomo, Lauriane, Manh, Moencopi, Lucile, Ismail, Marco, Sarah, Josquin, Emile, Corentin, Caroline, Monica, Azita, Ya, Charlotte, Brice, Emile, Teng, Claire, Floriane, Céline, Miza, Ayako... Merci à tous de contribuer à cette très bonne ambiance dans l'équipe, au quotidien ainsi qu'à l'occasion de repas, de pots ou encore de tournages de films...

Je voudrais remercier aussi ma seconde équipe BPF pour leur accueil, leur sympathie et leur intérêt pour mon projet, même s'il est un peu éloigné de leurs thématiques habituelles. Même si j'y étais un peu moins présente, c'était toujours un plaisir d'y aller pour discuter ou profiter des pots ! Merci en particulier à Timea et Iryna, qui ont traversé avec moi l'épreuve qu'est la thèse ! Merci aussi à Mennat, Natacha, Murielle, Lasse, Laxmi, Mélanie, Corinne, Marie-Elisabeth, Thierry, Margot, Thierry, Emilie, Christelle...

Je souhaite aussi remercier les membres, anciens et actuels, de la plateforme de l'IPGG : Guillaume, Olivier et Nawel qui ont vu mes débuts en thèse et donc en microfabrication et microscopie. Et merci aussi à Bertrand, Kévin et Nhung maintenant ! Merci beaucoup pour votre aide et les discussions très sympathiques au détour du couloir !

Merci aussi à toutes les personnes qui participent au bon fonctionnement du labo et de l'IPGG, notamment Perrine, Sylvia, Manon, Rolie et aussi Giulia pour notre équipe !

Merci à l'équipe de Microscale Affairs de m'avoir recrutée et de continuer à organiser ces séminaires : Miza, Lucie, Léa, Alice, Terence...

J'ai ainsi pu faire la connaissance de camarades thésardes du 3e étage : merci à Lucie et Léa pour tous ces goûters à base de crêpes ou de gaufres, et pour les discussions qui les accompagnent où l'on peut partager notre vie de thésards !

Au-delà des personnes que j'ai rencontrées pendant ma thèse, j'ai aussi pu compter sur le

soutien de mes amis en dehors du laboratoire ! Un grand merci à Claire, pour toutes nos discussions, sérieuses ou pas, et pour toutes les aventures qu'on a partagées, ainsi qu'à Antoine et aussi Votte, qui ont suivi régulièrement l'avancement de ma thèse, avec ses hauts et ses bas, grâce à nos déjs de thésards où l'on racontait notre vie ! Merci aussi à Adrien, Marion et Manu pour ces petites escapades sympathiques qui nous laisseront plein de souvenirs ! Merci également aux autres copains de l'X : Mathilde, Rémi, Émeline, Théo, Kévin, Tiphaine, Nicolas. Merci aussi à la chambre 314 : KS, Babeth et Caro, c'est toujours un plaisir de se revoir après toutes ces années ! Et merci aussi à Elise, mon amie de longue date !

Enfin, je voudrais remercier mes parents qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui ! Merci aussi à Delphine pour son soutien pendant toutes ces années, merci à Quentin, et à Axel, le nouveau venu dans la famille qui a bien réussi à me divertir pendant la rédaction ! Et merci beaucoup à Nico, qui a été présent à mes côtés tout au long de ces années de thèse mais aussi bien avant pour me soutenir, me réconforter dans les moments difficiles, et partager avec moi tous ces moments de bonheur !

Table des matières

Avant-propos **1**

1 Introduction **5**

1.1 Les champignons . . . 5

1.1.1 Diversité des espèces . . . 5

1.1.2 Les pathogènes de l'Homme . . . 7

1.1.3 Le genre *Candida* . . . 9

1.2 *Candida albicans* . . . 10

1.2.1 Morphologie et structure . . . 10

1.2.2 Croissance hyphale . . . 14

1.2.3 Mécanisme d'invasion . . . 21

1.2.4 Autres facteurs de virulence . . . 25

1.2.5 Traitements antifongiques . . . 28

1.3 Utilisation de la microfluidique pour l'étude de systèmes biologiques . . . 30

1.3.1 La microfluidique . . . 30

1.3.2 Intérêt pour les systèmes biologiques . . . 31

1.4 Objectifs du projet . . . 34

2 Méthodes expérimentales **37**

2.1 Microfabrication . . . 37

2.1.1 Design global des puces . . . 37

2.1.2 Fabrication des moules . . . 39

2.1.3 Soft lithographie . . . 42

2.1.4 Scellement des puces . . . 44

2.1.5 Caractérisation . . . 45

2.2 Positionnement des levures . . . 46

2.2.1 Résistance hydrodynamique . . . 48

2.2.2 Optimisation du piégeage des levures . . . 49

2.3 *Candida albicans* . . . 50

2.3.1 Conditions de culture . . . 50

2.3.2 Croissance dans un gel d'agar . . . 51

2.3.3 Souches utilisées . . . 51

2.3.4 Méthode de transformation . . . 52

2.4 Imagerie . . . 57
2.4.1 Microscopie . . . 57
2.4.2 Marquage au Calcofluor White . . . 59

3 Caractérisation mécanique des hyphes 61
3.1 Introduction . . . 61
3.1.1 Mesures de propriétés mécaniques . . . 62
3.1.2 Mesures de propriétés mécaniques avec la microfluidique . . . 65
3.1.3 Discussion . . . 69
3.2 Principe de la mesure de rigidité . . . 69
3.2.1 Mise en œuvre expérimentale . . . 71
3.2.2 Simulations numériques . . . 73
3.2.3 Modèle théorique . . . 76
3.3 Résultats sur la rigidité des hyphes . . . 82
3.3.1 Mesure du module de flexion et module de Young . . . 82
3.3.2 Effet d'un antifongique . . . 84
3.3.3 Comparaison avec une autre souche . . . 86
3.4 Caractérisation de la force exercée par les hyphes . . . 87
3.4.1 Méthode de fabrication : *stop-flow lithography* . . . 88
3.4.2 Paramètres à contrôler . . . 89
3.4.3 Interaction avec les hyphes . . . 91
3.5 Discussion et perspectives . . . 91
3.5.1 Discussion . . . 91
3.5.2 Limitations de la mesure de rigidité . . . 92
3.5.3 Autres développements envisagés . . . 93

4 Croissance sinusoïdale/hélicoïdale des hyphes 97
4.1 Introduction . . . 97
4.1.1 Thigmotropisme et croissance sinusoïdale/hélicoïdale des hyphes . . . 97
4.1.2 Autres réponses des hyphes à un contact . . . 104
4.1.3 Autres organismes . . . 106
4.2 Caractérisation des sinusoïdes de *C. albicans* . . . 108
4.3 Observations de croissance sinusoïdale ou hélicoïdale . . . 109
4.3.1 Sur un substrat adhésif . . . 109
4.3.2 Confinement 3D dans un gel d'agar . . . 110
4.4 Confinement axial dans une puce microfluidique . . . 114
4.4.1 Observation de croissance sinusoïdale . . . 114
4.4.2 Effet de la hauteur des canaux sur la forme des sinusoïdes . . . 115
4.4.3 Variation du diamètre des hyphes . . . 116
4.4.4 Effet de la vitesse de croissance . . . 116
4.4.5 Longueur et durée d'une période . . . 118

4.4.6 Corrélation entre amplitude et longueur d'onde 120
4.4.7 Bilan 120
4.4.8 Autre remarque : position des septums en croissance sinusoïdale 121
4.4.9 Adaptation aux changements de contraintes 122
4.5 Changements biologiques associées à ce type de croissance 124
4.5.1 Spitzenkörper 124
4.5.2 Paroi 125
4.6 Discussions et perspectives 127
4.6.1 Conditions d'observations 127
4.6.2 Forme adoptée : sinusoïdes ou hélices ? 129
4.6.3 Initiation de ce mode de croissance 129
4.6.4 Mécanismes mis en jeu 130
4.6.5 Autres perspectives 133
4.6.6 Conclusions 135

5 Cycle cellulaire **137**
5.1 Introduction 137
5.1.1 Cycle cellulaire 137
5.1.2 Cycle cellulaire chez *C. albicans* 142
5.2 Etude du cycle cellulaire dans la forme hyphale de *C. albicans* 144
5.2.1 Puces et souches utilisées 145
5.2.2 Analyse d'images 145
5.3 Description des différentes étapes du cycle cellulaire chez *C. albicans* 148
5.3.1 Naissance 148
5.3.2 De la naissance à l'apparition du préseptum 149
5.3.3 De l'apparition du préseptum à la division du noyau 150
5.3.4 De la division nucléaire à la division cellulaire 152
5.3.5 Formation de branchement 153
5.4 Vitesse de croissance et cycle cellulaire 153
5.4.1 Vitesse de croissance par article 154
5.4.2 Vitesse de croissance par phase 155
5.4.3 Vitesse de croissance globale 157
5.5 Régulation du cycle cellulaire chez *C. albicans* 157
5.5.1 Régulation pour les hyphes 157
5.5.2 Comparaison avec les levures 162
5.6 Discussion et perspectives 164
5.6.1 Dynamique du cycle cellulaire 164
5.6.2 Des cycles nucléaires et cellulaires décorrélés ? 165
5.6.3 Régulation du cycle cellulaire de *C. albicans* 166

Conclusion **169**

A Design des puces **171**

B Génotype des souches **173**

C Flexion d'un cylindre **175**

D Analyse d'images pour croissance sinusoïdale **179**

D.1 Interface substrat-agar 179

D.2 Dans les puces microfluidiques 180

E Cylindre sous confinement **183**

Bibliographie **185**

AVANT-PROPOS

La biophysique est un domaine relativement récent qui a émergé de l'utilisation des outils de la physique afin d'étudier des processus biologiques. Les apports de la physique ont ainsi été multiples au fil des années. On peut mentionner par exemple et de façon évidente le développement de techniques d'imagerie plus ou moins complexes, allant du simple microscope permettant d'observer des échantillons biologiques aux outils d'imagerie médicale comme la radiographie ou les IRM. Cependant, la biophysique ne se limite pas au développement de technologies appliquées à la biologie, et a pour vocation de contribuer à une meilleure compréhension du monde vivant en apportant des concepts physiques. Ce monde du vivant fascine bon nombre de scientifiques, biologistes ou physiciens, du fait de sa complexité, sa diversité, sa capacité d'adaptation et regorge encore de nombreuses questions. Se placer à l'interface entre la physique et biologie est souvent nécessaire et fructueux : la découverte de la structure de l'ADN grâce à la diffraction des rayons X, l'étude de l'hydrodynamique pour l'écoulement de la circulation sanguine ou de la forme des cellules par analogie avec des mousses, le rôle de courants électriques dans la transmission nerveuse ; les exemples sont multiples.

Plus récemment, le développement de la microfluidique a permis de s'intéresser encore plus à ces organismes biologiques, en s'approchant un peu plus de la situation *in vivo*. En effet, pour comprendre le fonctionnement d'un objet biologique, la première étape est tout simplement de pouvoir l'observer, et de l'observer dans un environnement dont les paramètres sont contrôlés, qu'il soit artificiel ou au contraire qu'il essaie d'être le plus biomimétique possible. Ainsi le domaine de la microfluidique a révolutionné l'étude des organismes vivants, en commençant par les cellules animales et les bactéries notamment. Cela a donc permis de mieux caractériser leurs propriétés physiques et mécaniques comme leur rigidité ou l'adhésion à différents substrats, d'étudier leur réponse à divers stimuli, mécaniques ou chimiques, la façon dont elles migrent... En combinant cela à des outils de biologie, notamment le travail précieux d'identification des gènes et des transformations génétiques afin d'obtenir des cellules avec des marquages spécifiques, ou des délétions spécifiques de gènes, de véritables avancées dans la compréhension de ces organismes peuvent être réalisées.

Ce nouveau domaine de la microfluidique pour la biologie semble néanmoins avoir quelque

peu délaissé pendant de nombreuses années le monde fascinant des champignons au profit des bactéries et des cellules animales notamment. On se propose ici de plonger dans cet univers, relativement peu connu en dehors des champignons qui poussent dans la forêt, mais tout de même plein de mystères. Notre étude se concentrera sur un champignon, peut-être le plus connu parmi les pathogènes de l'Homme : *Candida albicans*. Ce nom évoque généralement les candidoses et autres désagréments de ce type, mais le grand public n'a pas vraiment conscience que cette levure, présente chez une grande partie de la population et donnant lieu effectivement à des infections mucosales relativement bénignes, est également responsable de centaines de milliers de morts dans le monde. Alors comment cette petite levure peut-elle devenir si dangereuse ? Et comment se déroule l'infection d'un organisme ? Même si de nombreux éléments ont déjà été découverts et en particulier la transition morphologique vers une forme filamenteuse invasive ainsi que leur capacité de pénétration des tissus épithéliaux, de nombreuses questions demeurent concernant la croissance de ces filaments. L'objectif de cette étude est de mettre les outils de la microfluidique et de la physique au service de la compréhension de cet organisme biologique, notamment de sa croissance filamenteuse.

Dans un premier chapitre, nous commencerons par présenter au lecteur la diversité des champignons, pathogènes ou non, pour se focaliser ensuite sur notre organisme d'étude, *C. albicans*. Nous décrirons ses particularités morphologiques, en nous intéressant plus particulièrement à sa croissance sous forme de filaments appelés hyphes. Les mécanismes physiques et biologiques entrant en jeu dans cette croissance seront également détaillés. Puis la virulence de ce pathogène sera discutée, en détaillant la compréhension actuelle du processus d'invasion, ainsi que les cibles thérapeutiques identifiées à ce jour. Enfin, nous parlerons du développement de la microfluidique pour l'étude d'organismes biologiques, et des différents avantages qu'elle présente.

Le deuxième chapitre a pour objectif de présenter les méthodes expérimentales utilisées tout au long de notre étude. Il concerne tout d'abord la microfabrication, pour laquelle les procédés généraux utilisés de façon standard sont détaillés ainsi que les développements plus spécifiques qui ont été mis en œuvre. Dans le but d'optimiser nos expériences, un design spécifique des puces microfluidiques a été adopté et est discuté. Enfin, on s'intéressera à la culture de *C. albicans* et à la méthode de transformation génétique communément utilisée pour obtenir des mutants.

Le troisième chapitre présente des méthodes développées dans le but de caractériser les propriétés mécaniques des hyphes. Une introduction aura pour objectif de présenter des exemples d'outils, microfluidiques ou non, destinés à la caractérisation mécanique de cellules similaires. D'une part, le développement d'un dispositif microfluidique dédié à la mesure de leur rigidité par flexion est détaillé, en combinant le modèle théorique et les résultats expérimentaux obtenus. D'autre part, des résultats préliminaires impliquant la photopolymérisation d'un piston sont présentés avec pour objectif la mesure de la force développée par les hyphes.

Dans le quatrième chapitre, on s'intéressera à un comportement bien particulier et étonnant des hyphes, mais très peu documenté : leur croissance de façon sinusoïdale ou hélicoïdale. Nous commencerons par faire l'état des lieux de la façon dont la croissance des hyphes est affectée par leur environnement physique. Puis les conditions d'observation de ce mode de croissance seront présentées, et leur croissance sinusoïdale en 2D sera caractérisée en confinement imposé

dans des puces microfluidiques. Nous discuterons également des mécanismes potentiellement à l'origine de ces oscillations.

Au cours de notre étude de *C. albicans*, nous nous sommes rendus compte de l'incroyable dynamique et régularité du cycle cellulaire de ses filaments. Le cinquième chapitre sera donc l'occasion d'aborder le domaine d'étude très vaste qu'est le cycle cellulaire. Après une courte introduction, évidemment non exhaustive, sur les cycles cellulaires et leur régulation, nous commencerons par décrire les différents événements se déroulant au cours d'un cycle, en comparaison avec celui des levures. Puis chaque étape sera étudiée plus précisément, au niveau des vitesses de déplacement ainsi que d'une éventuelle régulation en taille.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

Marie Curie

1.1 Les champignons

Les champignons ont longtemps été considérés comme des végétaux, à cause de certaines similarités, notamment le fait qu'ils possèdent tous deux une paroi cellulaire rigide.

Cependant, ils se distinguent des plantes car ils ne possèdent pas de chloroplastes et ne réalisent pas de photosynthèse. En 1969, ils ont ainsi été classés dans un règne spécifique, distinct des plantes et des animaux, celui des *Fungi*.

1.1.1 Diversité des espèces

Les champignons sont omniprésents dans l'environnement, et sont très diversifiés, tant au niveau de leur taille et morphologie qu'au niveau de leur habitat. On peut ainsi trouver des organismes unicellulaires de seulement quelques micromètres comme les levures, des organismes multicellulaires comme les hyphes que l'on décrira longuement dans la section suivante, ou encore des structures macroscopiques. Ils peuvent être présents dans les sols, dans l'air, dans les plantes ou chez les animaux en général.

120 000 espèces de champignons sont actuellement décrites, mais leur diversité est probablement bien plus importante. Le nombre d'espèces a en effet été estimé à plusieurs millions [1], ce qui en ferait le plus grand règne des eucaryotes. Un aperçu de cette diversité est représenté sur la figure 1.1.

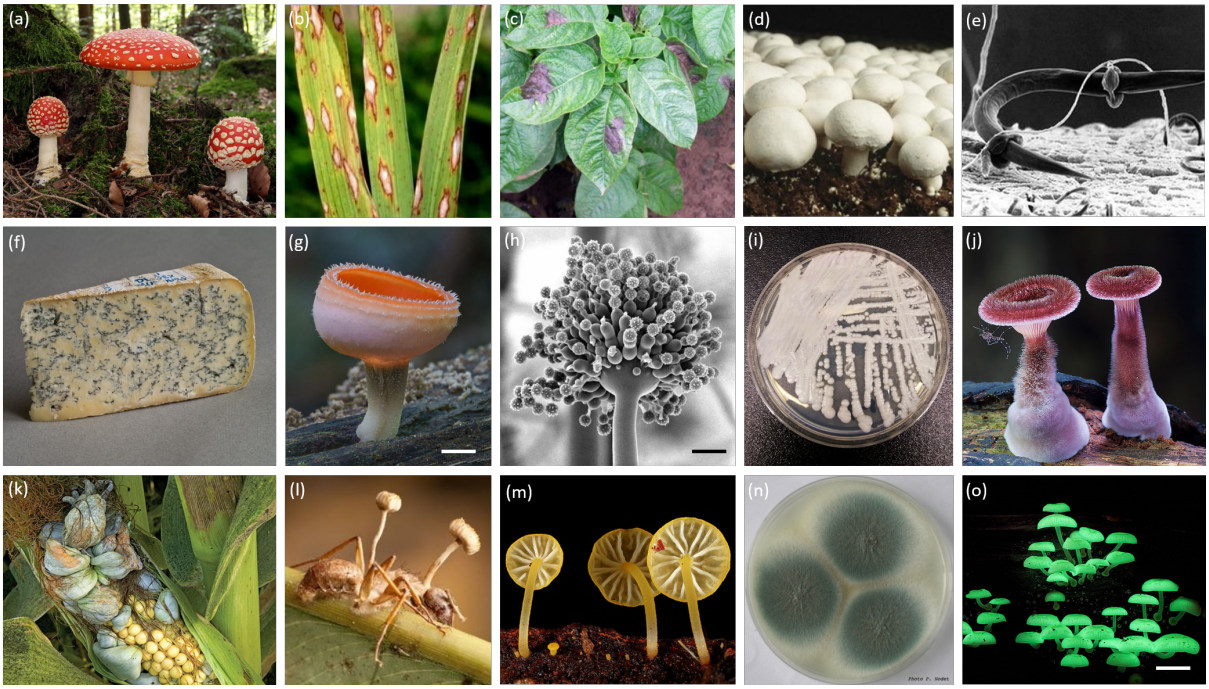


FIGURE 1.1 – Exemples de la diversité des champignons avec des espèces différentes en terme de formes, de tailles, de couleurs et de provenance. (a) *Amanita muscaria* plus connu sous le nom d'amanite tue-mouches [1] ; (b) pathogène des cultures de riz *Magnaporthe grisea* [2] ; (c) *Phytophthora infestans* responsable du mildiou des pommes de terre [3] ; (d) *Agaricus bisporus* cultivé sous le nom de champignon de Paris [4] ; (e) *Drechslerella anchonia*, un champignon capable de piéger le nématode *C. elegans* [5] ; (f) *Penicillium roqueforti* utilisé pour la production de fromages bleus comme le roquefort [6] ; (g) *Cookeina sulcipes* [7] (échelle : 1 cm) ; (h) image de microscopie électronique de *Aspergillus niger* [8] (échelle : 10 µm) ; (i) culture de *Candida auris* [9] ; (j) *Panus fasciatus* [10] ; (k) *Ustilago maydis*, responsable d'une maladie du maïs [11] ; (l) *Ophiocordyceps unilateralis*, un champignon parasitant des fourmis [12] ; (m) champignon du genre *Campanella* [10] ; (n) culture de *Aspergillus fumigatus* [13] ; (o) *Mycena chlorophos*, un champignon bioluminescent [10] (échelle : 20 mm).

Les champignons représentent un composant majeur de la biosphère ayant un impact important sur notre vie, bien au-delà des seuls champignons que l'on trouve dans nos assiettes.

1. https://fr.wikipedia.org/wiki/Amanite_tue-mouches
2. http://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/rice_diseases/rice_1.html
3. https://www.agro.basf.fr/fr/cultures/pomme_de_terre/maladies_de_la_pomme_de_terre/mildiou_pomme_de_terre.html
4. http://champignonscomestibles.com/culture-champignon-paris
5. https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/6069
6. https://en.wikipedia.org/wiki/Blue_cheese
7. https://www.thisiscolossal.com/2019/10/marin-mushrooms-pollack/
8. https://twitter.com/csiro/status/904177129381703681
9. https://www.liberation.fr/checknews/2019/07/15/doit-on-avoir-peur-du-champignon-candida-auris_1738178
10. https://www.demilked.com/fungi-mushroom-photography-steve-axford/
11. https://www.macleans.ca/education/university/delectable-corn-fungus/
12. https://twitter.com/tucpakoa/status/1140211233037148160
13. http://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Les+fiches+pratiques/aspfumig

Apports et utilisation de certains champignons

Certains champignons ont des interactions mutuellement bénéfiques, avec des racines de plantes par exemple (mycorhizes). Ils favorisent la croissance de ces plantes en augmentant l'absorption d'eau et de nutriments.

Les champignons permettent également la décomposition de matière organique et participent ainsi au recyclage des éléments qui la composent.

Certains ont été largement utilisé pour les besoins de l'Homme. Cela inclut en particulier l'industrie agro-alimentaire à travers la fermentation. *Saccharomyces cerevisiae* est la levure de boulanger utilisée pour la réalisation du pain, mais également pour la production d'alcools comme la bière.

Ils présentent aussi un intérêt d'un point de vue médical. L'exemple le plus connu est la pénicilline qui est un antibiotique dérivé de l'espèce de champignon *Penicillium chrysogenum*.

Pathologies associées aux champignons

Nous nous intéresserons particulièrement dans la suite aux pathogènes de l'Homme, mais ils ne sont pas les seuls à représenter un risque majeur pour les organismes qu'ils colonisent.

En effet, plus de 8000 espèces de champignons sont des pathogènes de plantes, responsables de la destruction d'un nombre considérable de cultures. On peut citer notamment *Magnaporthe grisea* (souvent appelé *rice blast fungus*) qui est le premier pathogène des cultures de riz (représenté sur la figure 1.1b). Ce redoutable pathogène peut infecter les feuilles ainsi que les racines, et a développé des résistances aux traitements chimiques. Il est ainsi responsable d'une perte importante de récolte chaque année dans le monde, qui permettrait selon des estimations de nourrir environ 60 millions de personnes. Les champignons sont responsables des 5 maladies les plus dévastatrices pour les cultures, qui touchent principalement le riz, le blé, le maïs, le soja et les pommes de terre.

Ainsi, les *fungi* mettraient en danger tout notre écosystème en affectant des plantes mais aussi des animaux [2].

1.1.2 Les pathogènes de l'Homme

Parmi ces champignons, environ 300 sont connus pour être des pathogènes de l'Homme. Nous connaissons tous les infections superficielles bénignes qu'ils peuvent causer, souvent appelées mycoses. Mais leur potentiel infectieux est souvent sous-estimé car ces infections, bien que gênantes, ne sont pas graves et peuvent être facilement soignées.

Cependant, les *fungi* sont aussi responsables d'infections invasives beaucoup plus difficiles à traiter et qui entraînent un taux de mortalité important. Une récente étude estime qu'environ 1,6 million de personnes meurent chaque année à cause d'une infection fongique [3], soit l'équivalent des décès liés à la tuberculose ou à la malaria [4]. Ce coût extrêmement important en nombre de vies s'accompagne aussi d'un coût financier élevé.

Plusieurs raisons peuvent expliquer une telle épidémiologie. Tout d'abord, les infections fongiques dépendent de beaucoup d'autres facteurs de risque. Cela concerne particulièrement les

patients avec une déficience immunitaire (VIH ou virus de l'immunodéficience humaine), les bénéficiaires de transplantations ou encore les patients recevant un traitement lourd contre le cancer. Ainsi, l'augmentation du nombre de patients immunodéficients dans les 50 dernières années a donné lieu à une forte augmentation du nombre de décès liés aux champignons. La propagation du SIDA en est une des principales raisons.

Ces maladies fongiques sont assez difficilement diagnostiquées, et un diagnostic précoce pour permettre un traitement efficace est d'autant plus compliqué. Cela peut s'expliquer notamment par le fait que certains commensaux [1] déjà présents dans l'organisme deviennent des pathogènes, et aussi parce que les symptômes ne sont généralement pas spécifiques.

Un autre problème essentiel implique les traitements possibles. Il y a en effet assez peu d'antifongiques disponibles : le nombre de cibles thérapeutiques est très limité et certains traitements présentent des problèmes de toxicité. De plus, des espèces sont naturellement résistantes à certains antifongiques et de plus en plus de résistances émergent suite à des traitements prolongés [5].

À cela s'ajoute un problème économique. Même lorsqu'un traitement antifongique pourrait être efficace, il n'est pas nécessairement administré. En effet, les pays pauvres, les plus touchés par ces maladies, n'ont pas ou très peu accès à ces traitements [6].

Les champignons les plus connus du point de vue médical sont ceux du genre *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* et *Pneumocystis*. On détaillera dans la suite quelques particularités des infections causées par ces pathogènes [7].

Cryptococcus

Le genre *Cryptococcus* comporte plusieurs dizaines d'espèces dont la plupart vivent dans le sol et ne sont pas dangereuses pour l'Homme. *Cryptococcus neoformans* est le principal pathogène de ce genre. C'est une levure encapsulée que l'on trouve dans l'environnement, notamment dans les sols. La contamination se produit par inhalation de spores, qui se disséminent ensuite dans les poumons et jusqu'au système nerveux central. Il est responsable de formes graves de méningites et affecte principalement les personnes avec un déficit d'immunité, notamment celles atteintes de VIH. Il est présent dans le monde entier, mais l'Afrique et l'Asie du Sud étant beaucoup plus touchés par le SIDA, l'incidence des infections au *Cryptococcus* y est aussi nettement plus élevée. Le taux de mortalité en cas de méningite cryptococcale traitée à l'aide d'antifongiques se situe entre 6 et 15 %, mais atteint 100 % sans aucun traitement [7].

Aspergillus

Les espèces d'*Aspergillus* peuvent être présentes dans une grande variété d'habitats, comme le sol, les feuilles, l'air ou de la nourriture. Elles peuvent se développer dans les poumons et provoquer des aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques ou des aspergillomes qui sont des infections locales au niveau d'une cavité du poumon. *Aspergillus fumigatus* est l'agent principal

1. Un commensal est une espèce qui tire un bénéfice de son interaction avec son hôte, sans être lui même bénéfique ni néfaste.

des aspergilloses invasives, la forme la plus grave, associée à un taux de mortalité très élevé de l'ordre de 40 %. Il cible principalement les patients immunodéficients suite à une transplantation de moelle osseuse ou d'organes, une leucémie ou un cancer [7].

1.1.3 Le genre *Candida*

Près de 200 espèces de *Candida* sont connues, la plupart sont des levures à l'exception de quelques unes qui peuvent se développer également sous forme d'hyphes. Seules quelques espèces sont responsables de candidoses chez l'homme, dont *Candida albicans* qui est le pathogène fongique le plus courant.

Les levures du genre *Candida* peuvent provoquer différents types de maladies, allant d'infections locales et superficielles à des infections systémiques et invasives [8].

Les plus communes sont celles de la peau et des muqueuses, notamment dans la bouche ou au niveau de la muqueuse vaginale. Les candidoses vulvo-vaginales sont principalement causées par *C. albicans* et affectent 75 % des femmes au moins une fois dans leur vie. Elles peuvent donc se produire non seulement chez des patients immunodéficients mais également chez des personnes saines. Les candidoses buccales (souvent appelées muguet buccal) touchent majoritairement des nourrissons ou des personnes atteintes d'autres maladies (diabète, cancer, SIDA...).

Les espèces de *Candida* sont aussi responsables d'infections beaucoup plus graves : les candidoses invasives. Dans ce cas, les champignons parviennent à traverser les barrières épithéliales et à pénétrer dans la circulation sanguine. C'est ce qu'on appelle une infection systémique (ou ici une candidémie). Ils peuvent alors se disséminer dans tout l'organisme de l'hôte et envahir d'autres organes.

Le genre *Candida* est considéré comme la 4ème principale cause d'infections sanguines nosocomiales [2], derrière le staphylocoque notamment [9].

Il est important de noter que la plupart des candidoses sont endogènes, cela signifie que le patient est lui-même la source de l'infection. En effet, les espèces *Candida* sont des commensaux du microbiote. Ils sont ainsi appelés pathogènes opportunistes car ils tirent profit d'une faiblesse de l'organisme pour l'infecter et l'envahir. Une autre voie de contamination, exogène cette fois, est l'introduction directe de cathéters par exemple.

A nouveau, l'immunodéficience est un facteur de risque majeur pour ces candidoses invasives. *C. albicans* serait responsable de plus de la moitié de ces maladies, suivi par *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*.

Notons également l'émergence de *C. auris* ces dernières années. Ce pathogène, décrit pour la première fois en 2009 [10], est presque toujours résistant à une classe d'antifongiques généralement utilisés pour traiter les infections de *Candida*, et des souches multirésistantes sont de plus en plus souvent isolées. Sa présence persistante sur les surfaces et sa résistance aux protocoles de décontamination classiques en font un pathogène très dangereux [11].

2. Une infection nosocomiale est une infection acquise à l'hôpital

1.2 *Candida albicans*

Nous allons maintenant nous intéresser plus spécialement à notre objet d'étude : *C. albicans*. L'objectif de cette partie est de donner une vue d'ensemble de ce pathogène opportuniste : ses caractéristiques, la façon dont il interagit avec nos barrières épithéliales, les multiples facteurs favorisant sa virulence ainsi que les traitements antifongiques utilisés à ce jour.

1.2.1 Morphologie et structure

Commençons par décrire quelques propriétés de *C. albicans*, indispensables à la compréhension de sa croissance et son mécanisme d'invasion.

Différentes morphologies

L'une des principales propriétés de *C. albicans* est sa capacité à changer de morphologies. En effet, on peut trouver ce champignon sous de nombreuses formes différentes, selon les conditions de culture dans lesquelles il se trouve (température, milieu de culture, substrat etc). Le schéma en figure 1.2 montre la complexité des mécanismes de régulation des différentes morphologies [12] .

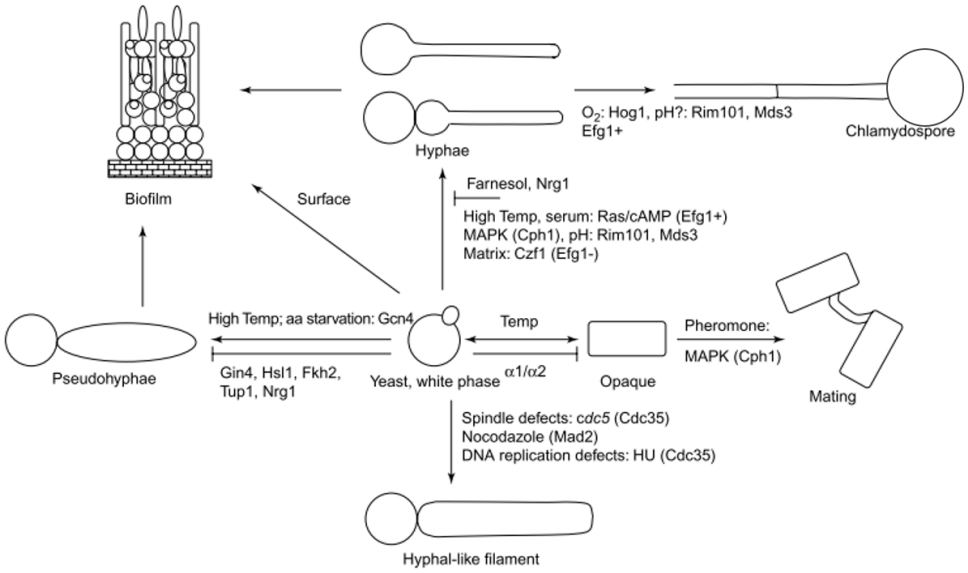


FIGURE 1.2 – Différentes morphologies adoptées par *C. albicans* et les nombreux facteurs induisant ou inhibant ces transitions [12].

Dans cette étude, on s'intéressera principalement aux levures, pseudo-hyphes et hyphes, pour lesquelles des images représentatives peuvent être trouvées en figure 1.3.

Les levures sont des cellules unicellulaires rondes d'environ 5 µm de diamètre. Elles se multiplient par bourgeonnement (ce sont des *budding yeasts*), contrairement à d'autres levures comme *Schizosaccharomyces pombe* qui se séparent par scission. *C. albicans* est généralement cultivé *in vitro* à 30°C. Rappelons cependant que la niche écologique principale de *C. albicans*, quelle que soit sa forme, est l'Homme, donc un environnement à 37°C.

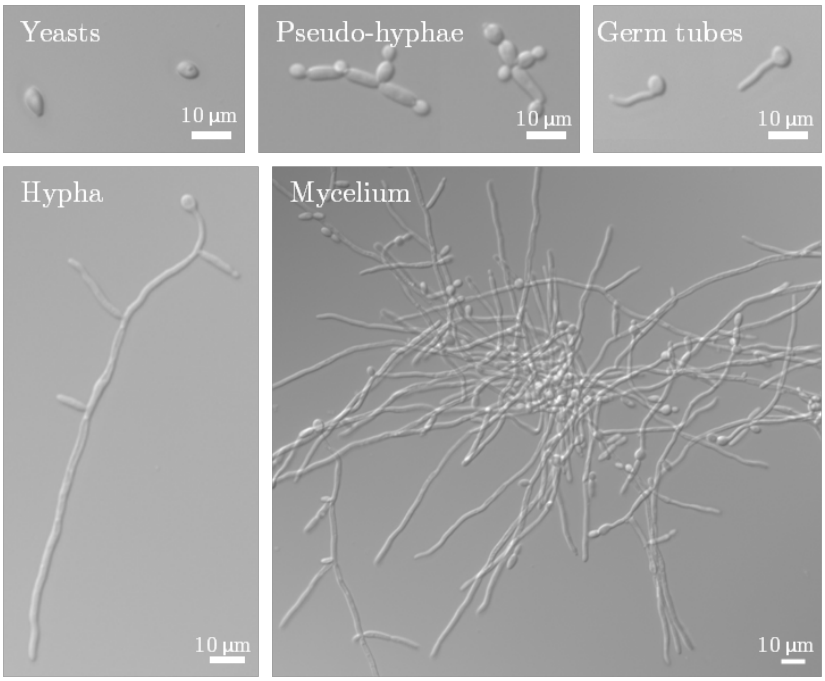


FIGURE 1.3 – Différentes morphologies adoptées par *C. albicans* selon les conditions de culture.

Les hyphes quant à elles sont des formes filamenteuses qui émergent des levures, comme on le voit sur la figure 1.3. Au début de leur formation, elles sont appelées tube germinatifs. Ces filaments sont des cylindres aux parois parallèles, de diamètre d'environ 2 µm. Ils sont en réalité constitués de compartiments, appelés articles et séparés par les anneaux du septum. Chacun de ces articles contient un noyau, comme on peut le voir sur la figure 1.4. Les particularités du cycle cellulaire des hyphes feront l'objet d'un chapitre spécifique dans ce manuscrit. On observe qu'elles peuvent aussi former des branchements, qui seront discutés plus en détail dans la suite.

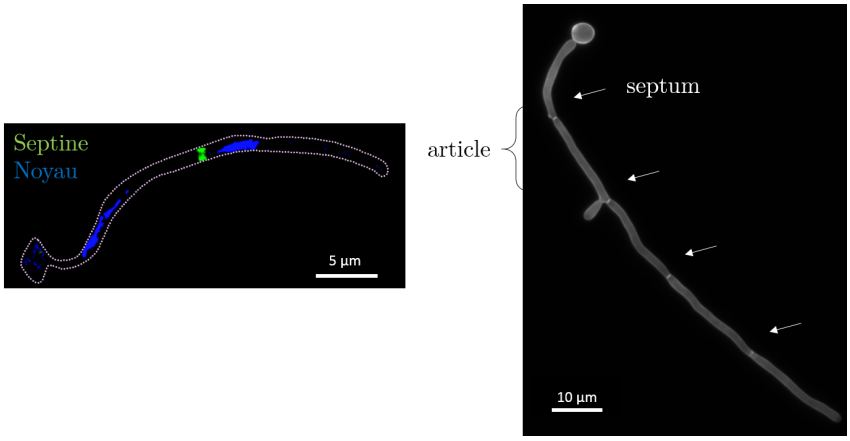


FIGURE 1.4 – Hyphes observées en microscopie à fluorescence montrant leur compartimentalisation. A gauche, le noyau apparaît en bleu et le septum en vert [13]. A droite, la paroi et les septums sont révélés par un marquage au Calcofluor White.

Les pseudo-hyphes ont une morphologie intermédiaire : elles présentent des constrictions entre les cellules, qui restent néanmoins attachées les unes aux autres. Ces cellules peuvent être

plus ou moins allongées, variant de la taille d'une levure à une taille proche de celle d'un article. Les compartiments cellulaires sont donc plutôt ovales, avec une largeur au centre supérieure à celle des hyphes. Un indice de morphologie se basant sur des paramètres géométriques mesurables (longueur, largeur maximale et taille de la constriction) permet de caractériser les différentes formes [14]. Ce paramètre étant continu, il ne permet pas de distinguer précisément les différentes morphologies. La constriction des pseudo-hyphes les rend fragiles et donc plus susceptibles de se séparer au niveau de la jonction entre cellules. Des expériences de sonication ont en effet montré que les pseudo-hyphes se séparent au niveau de leurs constrictions, tandis que les vraies hyphes sont résistantes [14].

D'autres transitions phénotypiques peuvent aussi se produire comme indiqué sur la figure 1.2, mais elles ne feront pas l'objet de cette étude. Il existe par exemple un changement morphologique et fonctionnel entre les cellules *white* et *opaque*. Les premières correspondent aux levures classiques, rondes et les secondes à une forme plus allongée. Cette transition est particulièrement étudiée dans le contexte de la reproduction sexuée [15]. Cela représente toutefois une faible proportion de la reproduction chez *C. albicans* qui est principalement asexuée. Des chlamydospores peuvent aussi être observées. Ces spores se forment dans des conditions environnementales très spécifiques à l'extrémité de pseudohyphes et sont largement plus grandes que des levures. Leur rôle reste cependant encore inconnu [16].

Induction de la filamentation

Un nombre important de voies de signalisation conduisant au déclenchement de la croissance hyphale a été décrit. La filamentation peut être obtenue à l'aide d'inducteurs chimiques comme le sérum ou la N-acétyl-D-glucosamine (ou GlcNac) par exemple [17] [18]. Une température de 37°C est également un facteur important permettant la formation d'hyphes. D'autres facteurs comme le taux de CO_2, le pH, le manque de nutriments ou le substrat peuvent avoir un effet sur la filamentation [19] [20].

Le quorum sensing peut aussi affecter la présence ou non de filaments. C'est un mécanisme de régulation de l'expression de gènes en fonction de la densité de la population de micro-organismes, qui passe par la sécrétion de molécules ainsi que la présence de récepteurs spécifiques. On a ainsi une forme de communication au sein de la population. Si la densité augmente, la concentration de ces molécules augmente également, et au-delà d'un certain seuil, cela va déclencher diverses fonctions selon l'espèce. Ce phénomène est bien connu pour les bactéries, mais son existence chez les champignons n'a été découverte qu'assez récemment. Il a notamment été montré que le farnésol est une molécule du quorum sensing, qui empêcherait la transition morphologique de la levure vers la forme filamenteuse, même en présence de milieu inducteur comme le sérum ou la N-acétyl-D-glucosamine [21] [22].

Il est au contraire bien plus difficile d'obtenir une culture systématique de pseudo-hyphes. On trouve généralement un mélange d'hyphes et pseudo-hyphes, d'autant qu'il est parfois difficile de les différencier comme on l'a expliqué plus haut. Ils sont plutôt induits dans des conditions moins favorables comme une température de 35°C. Il a également été montré qu'une concentration

élevée de phosphate pouvait favoriser leur apparition dans la culture [23].

Paroi cellulaire

Un élément extrêmement important chez les champignons est la présence d'une paroi cellulaire rigide.

Cette paroi est composée essentiellement de molécules absentes du corps humain, ce qui en fait une cible particulièrement intéressante pour une reconnaissance immunitaire.

Notons que la paroi constitue environ 30% de la biomasse sèche chez la levure [24] et que les gènes impliqués dans sa biosynthèse ou sa maintenance représentent 1/6 du génome. Elle représente donc un investissement conséquent pour la cellule, mais le fait de posséder une paroi cellulaire rigide lui procure l'avantage de pouvoir soutenir des pressions de turgescence internes importantes, et ainsi de pouvoir exercer des forces considérables. Elle aide aussi au maintien de la forme des levures et hyphes, et leur donne une bonne résistance physique.

La paroi, dont la structure est représentée sur la figure 1.5, est organisée en 2 couches :

- une couche extérieure composée majoritairement de mannanes, ainsi que de glycoprotéines.

- une couche interne contenant des polysaccharides : une grande majorité de β-glucanes (50-60 % en masse de la paroi) et de la chitine.

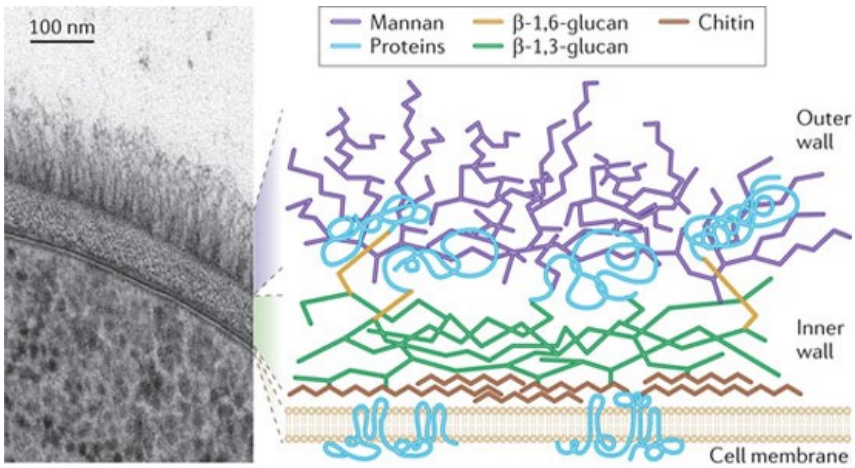


FIGURE 1.5 – Structure de la paroi cellulaire de *C. albicans* : image de microscopie électronique à transmission et schéma des composants de la paroi [25].

Une description bien plus précise des nombreux composants de la paroi peut être trouvée par ailleurs [26]. Les protéines de la paroi jouent également un rôle important pour l'interaction avec le milieu extérieur à travers leurs propriétés hydrophobes ou leur capacité d'adhésion par exemple.

Il est important de noter que la composition de la paroi peut varier. Les cellules s'adaptent notamment aux conditions environnementales en changeant la composition de leur paroi : par exemple, l'épaisseur de la couche interne diminue de moitié en passant d'un milieu contenant du glucose à un milieu avec du lactate [27].

Les divers outils permettant de caractériser les propriétés mécaniques de cette paroi rigide feront l'objet d'un chapitre spécifique.

1.2.2 Croissance hyphale

Nous souhaitons à présent comprendre comment une hyphe parvient à croître. De nombreux éléments entrent en jeu, mais la force motrice de cette croissance hyphale est la pression de turgescence.

Pression de turgescence

Ce processus est également présent dans d'autres organismes comme les plantes, puisqu'elles possèdent elles aussi une paroi rigide. On peut citer notamment les racines de plantes ou les tubes de pollen qui sont des tubes émis par les grains de pollen afin de transporter les gamètes mâles jusqu'aux ovules.

La turgescence est créée par osmose : ce phénomène correspond à un échange de liquide causé par une différence de concentration en soluté. Les différentes situations possibles, selon la composition du milieu extérieur, sont représentées sur la figure 1.6.

La concentration de substances actives osmotiquement est en général plus grande à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur (cas hypotonique sur la figure 1.6). Il va donc y avoir un transfert d'eau de la solution la moins concentrée vers la solution la plus concentrée pour obtenir un équilibre de concentration, c'est-à-dire de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. On observe un transfert d'eau et non pas de solutés (qui permettrait d'atteindre un équilibre de concentration également) car on a ici une membrane semi-perméable qui laisse passer l'eau mais pas d'autres substances.

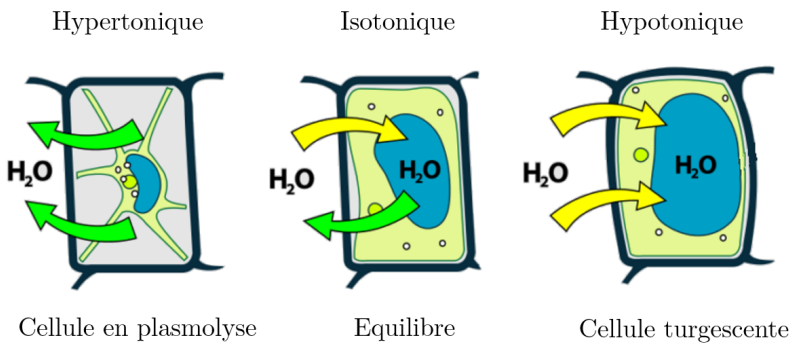


FIGURE 1.6 – Représentation schématique d'une cellule dans différentes conditions osmotiques. Un transfert d'eau entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule sert à équilibrer les concentrations en soluté. Dans le cas d'un milieu plus concentré à l'intérieur de la cellule, l'eau y rentre et crée ainsi une pression de turgescence interne.

Un apport d'eau dans une cellule sans paroi cellulaire se manifeste par un gonflement de la cellule, jusqu'à la lyse. Cependant, dans une cellule avec une paroi rigide, la membrane plasmique va être poussée contre la paroi et la pression dans le cytoplasme va augmenter, d'où la pression de

turgescence. Il y a donc ici un équilibre des forces entre la turgescence et la résistance mécanique de la paroi.

Cet effet d'osmose peut être constaté sur des hyphes en imposant des chocs osmotiques. Un exemple est représenté sur la figure 1.7 où la pression de turgescence interne est mesurée. Un traitement hyper-osmotique est appliqué à une hyphe de *Neurospora crassa* et on observe une réduction du volume de l'hyphe et de la pression, menant à l'arrêt de la croissance. Ce comportement correspond effectivement à l'expulsion de l'eau vers l'extérieur.

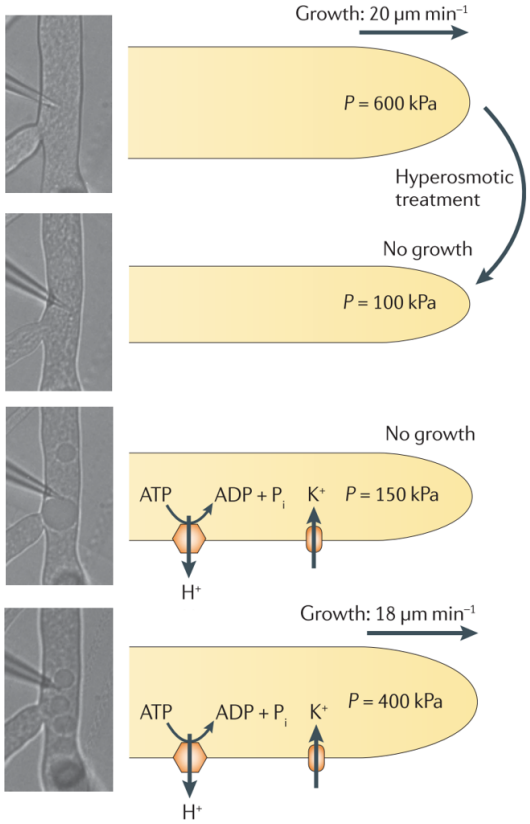


FIGURE 1.7 – Modification du volume de l'hyphe et de sa pression interne par choc osmotique suivi du rétablissement de la turgescence et de la croissance grâce aux mécanismes de régulation [28].

Notons tout de même que les champignons sont capables d'ajuster leur concentration interne en solutés afin de s'adapter aux divers environnements auxquels ils peuvent être confrontés [28]. L'hyphe sur la figure 1.7 est ainsi capable de réguler à nouveau sa pression de turgescence et de reprendre sa croissance après quelques minutes.

Les valeurs de pression de turgescence varient d'un organisme à un autre, et dépendent également du milieu environnant, mais l'ordre de grandeur se situe généralement autour de 0,5 MPa, ce qui correspond à peu près à la pression dans un pneu.

Mécanismes contribuant à la croissance hyphale

Les différents processus se déroulant à l'apex de l'hyphe sont résumés en majeure partie sur la figure 1.8. Nous allons maintenant expliciter la contribution de ces nombreux éléments à la croissance polarisée.

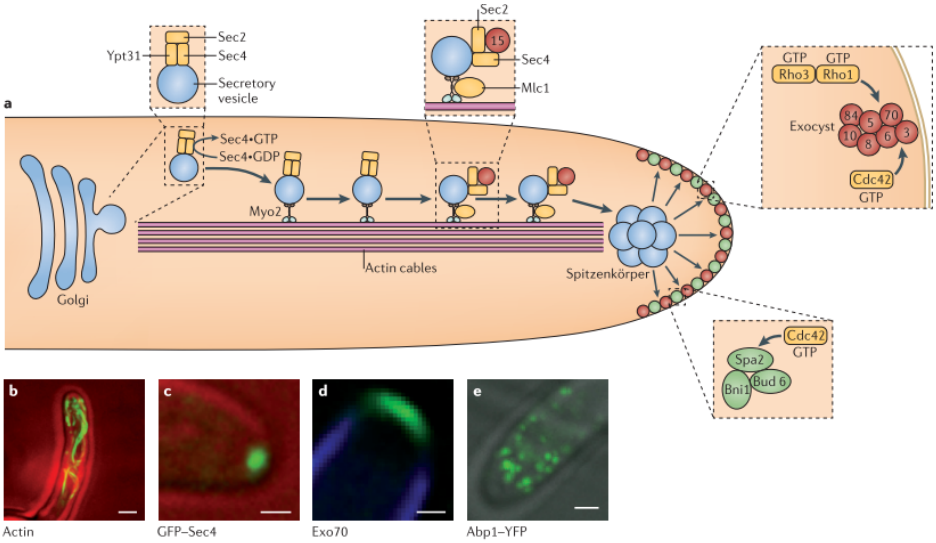


FIGURE 1.8 – Des vésicules sont transportées grâce au cytosquelette jusque dans la région subapicale où elles s'associent pour former le Spitzenkörper. Ces vésicules sont ensuite redistribuées vers la membrane de l'apex à l'aide de filaments d'actine initiés par le polarisome. Enfin l'exocyste permet l'ancrage de ces vésicules à la membrane, à laquelle elles fusionnent ensuite [29].

Extension de la paroi

En plus de cette force motrice, la croissance d'une hyphe requiert l'expansion de la membrane plasmique et de la paroi. La pression de turgescence a pour effet d'étirer la paroi, ce qui pourrait entraîner sa rupture sans l'incorporation de nouveau matériel de paroi. Les composants (protéines et enzymes) nécessaires à la synthèse de la nouvelle paroi doivent donc être transportés à l'aide de vésicules jusqu'à l'apex de l'hyphe. Il a été montré que l'expansion de la paroi se produit de façon orthogonale, ce qui est cohérent avec la pression de turgescence comme origine de la croissance [30].

Il existe des types de vésicules différents selon les espèces. Chez *Neurospora crassa* par exemple, les chitosomes sont des microvésicules, de taille inférieure à 100nm, qui transportent des enzymes qui synthétisent la chitine [31]. Les vésicules de *C. albicans* ont quant à elles toutes une taille d'environ 70 nm de diamètre [32].

Ces vésicules ont pour destination la pointe de l'hyphe. Elles vont pouvoir finalement fusionner à la membrane plasmique et ainsi délivrer leur contenu pour favoriser l'extension de la paroi cellulaire.

L'hypothèse actuelle considère que dans un premier temps, des enzymes, telles que des chitinases ou glucanases, assouplissent la paroi à l'apex en cassant des liaisons entre ces poly-

mères [33] [34]. Cela permettrait d'intégrer les vésicules de sécrétion apportant du nouveau matériel et donc d'étendre effectivement la paroi, et enfin d'autres enzymes pourraient réticuler ce réseau pour la rigidifier.

Ce processus de sécrétion nécessite également la participation de nombreux autres éléments dont on ne parlera pas ici, mais qui sont détaillés dans cette revue [35].

Complexes de polarité

Pour obtenir la formation d'hyphes, il est nécessaire d'avoir une croissance polarisée, c'est-à-dire orientée dans une seule direction. On va donc parler ici de certains complexes de polarité importants pour les champignons filamenteux, qui interviennent dans le processus d'apport de vésicules à l'apex.

En effet, les vésicules ne sont pas directement transportées jusqu'à l'extrémité de l'hyphe. Elles forment d'abord un amas sphérique au niveau de l'apex, structure que l'on appelle Spitzenkörper (ce qui signifie corps apical en allemand). On peut ainsi voir sur les figures 1.8c et 1.9 le marquage fluorescent d'une protéine associée aux vésicules, Sec4, qui forme un unique point très proche de la pointe de l'hyphe.

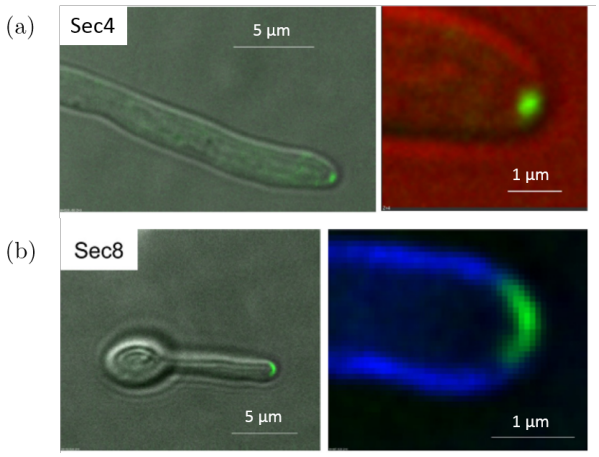


FIGURE 1.9 – Localisation de protéines fusionnées à la GFP à l'apex de l'hyphe : images en champ clair et en fluorescence [36]. (a) La protéine Sec4, qui est un composant du Spitzenkörper, est localisée en un point précis près de la pointe de l'hyphe. (b) La protéines Sec8, un composant de l'exocyste, se situe sur le contour de l'apex.

Le Spitzenkörper est considéré comme un centre d'approvisionnement de vésicules (*vesicle supply center* ou VSC), qui serait un point de transit entre leur arrivée et leur départ vers la membrane à l'apex. Un modèle permettant d'expliquer la croissance polarisée des hyphes a été développé en utilisant cette notion [37]. Le principe repose sur le fait que les vésicules seraient distribuées à partir du VSC (c'est-à-dire le Spitzenkörper) vers la surface dans toutes les directions de façon aléatoire, comme on le voit sur la figure 1.11a. Par conséquent, la position du Spitzenkörper devient déterminante dans la morphologie que le champignon va adopter. Etant donné que le Spitzenkörper se maintient à une distance proche de la pointe de l'hyphe,

la proportion de vésicules fusionnant à l'apex est largement plus grande qu'ailleurs, ce qui expliquerait la croissance polarisée.

Ce modèle semble être validé par plusieurs expériences. Dans l'une d'entre elles, les positions du Spitzenkörper sont relevées expérimentalement, puis intégrées au modèle pour obtenir la forme théorique du filament. Les trajectoires obtenues sont en bonne adéquation avec la réalité [38]. Dans une autre expérience, le déplacement du Spizenkörper a été induit artificiellement grâce à un laser [39] [40] : l'agrégat de vésicules s'éloigne du laser et réoriente la croissance de l'hyphe, comme on peut le voir sur la figure 1.10.

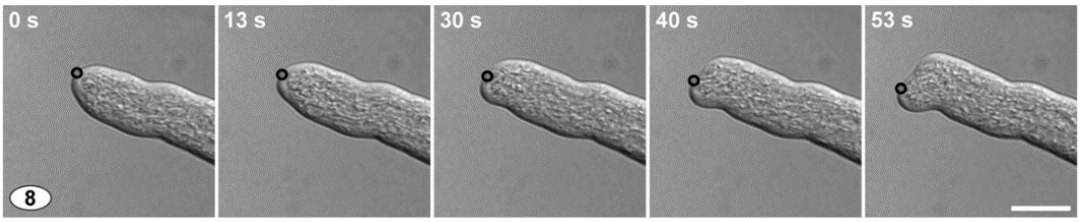


FIGURE 1.10 – Changement de direction de croissance par manipulation du Spitzenkörper. Le cercle correspond à la position du laser, ajusté au cours du temps pour repousser le Spitzenkörper. (Barre d'échelle = 10 µm) [39]

Cela nous montre également qu'un déplacement du Spitzenkörper est effectivement lié, et même précède un changement d'orientation de l'hyphe.

Le Spitzenkörper est une structure présente uniquement dans les hyphes en croissance, mais pas chez les levures ou pseudohyphes. Un autre complexe multiprotéique, le polarisome, est quant à lui retrouvé dans chacune de ces morphologies, couvrant soit le site de bourgeonnement des levures, soit la surface de l'apex pour les hyphes. Les protéines qui le constituent vont notamment pouvoir contribuer à l'assemblage des filaments d'actines impliqués dans le transport des vésicules.

Celles-ci doivent se fixer sur la membrane plasmique pour ensuite y fusionner. Ce mécanisme est facilité par un complexe de 8 protéines appelé exocyste [41], lui aussi situé à la surface de l'apex (comme la protéine Sec8 sur la figure 1.9). Comme on peut le voir sur cette figure, le Spitzenkörper est bien distinct du polarisome et de l'exocyste [42]. De plus, des expériences de photoblanchiment (FRAP et FLIP) ont montré que le Spitzenkörper était très dynamique contrairement au polarisome et exocyste qui sont relativement stables [36]. Cela correspond bien au fait que les vésicules du Spitzenköper sont en permanence renouvelées car elle ne cessent d'arriver et de partir vers l'apex.

Rôle du calcium

Un autre modèle pour expliquer la croissance polarisée des hyphes repose sur la concentration de calcium à l'apex (figure 1.11b). La présence d'un gradient de concentration cytoplasmique de Ca^{2+} orienté vers l'apex serait à la base de ce mécanisme. Le calcium facilite la fusion des vésicules avec la membrane plasmique et cette fusion aurait donc majoritairement lieu à

l'apex [33].

Notons également la présence de canaux ioniques, qui sont des protéines transmembranaires permettant le passage sélectif d'ions. Plusieurs types de canaux calciques ont été identifiés chez *C. albicans*. Cch1 est par exemple un canal voltage-dépendant, c'est-à-dire que son ouverture dépend de la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Mid1 est un canal mécanosensible qui peut générer un flux de Ca^{2+} en réponse à un stimulus mécanique. La délétion des gènes associés à ces deux canaux entraîne une grande réduction de l'apport de Ca^{2+} dans la cellule, ce qui correspond bien au rôle d'un canal ionique [43].

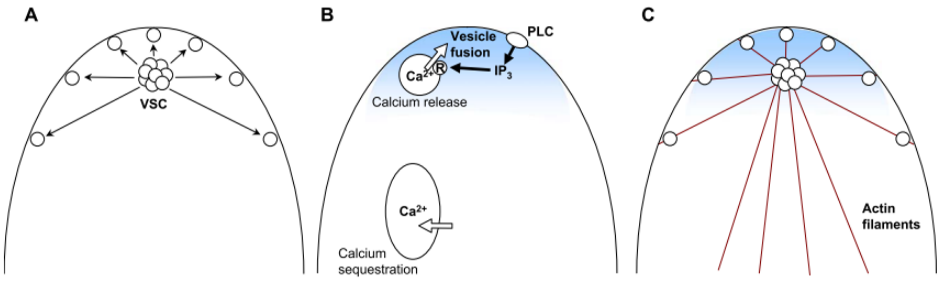


FIGURE 1.11 – Différents modèles cherchant à expliquer la croissance polarisée des hyphes. A) Le Spitzenkörper agirait comme un *vesicle supply center* pour distribuer les vésicules dans toutes les directions. B) Des protéines mécanosensibles entraîneraient une augmentation de la concentration en calcium à l'apex, qui y promeut la fusion des vésicules. C) Intégration des deux modèles précédents faisant intervenir à la fois le Spitzenkörper et le calcium ainsi que les filaments d'actine. [33]

Cytosquelette

Le cytosquelette des champignons joue un rôle important pour la structure et la croissance des hyphes. Mais contrairement aux cellules animales, les hyphes ne génèrent pas de forces grâce à leur cytosquelette mais bien grâce à la pression de turgescence.

Les protéines contenues dans les vésicules sont synthétisées par le réticulum endoplasmique et doivent voyager jusqu'à la pointe de l'hyphe. Le transport de ces vésicules s'effectue grâce au cytosquelette présent dans le filament. Celui-ci comporte des microtubules et des filaments d'actine.

Ce transport repose essentiellement sur le cytosquelette d'actine (figure 1.8a). Les filaments d'actine sont considérés comme des rails sur lesquelles les myosines qui sont des moteurs moléculaires transportent les vésicules jusqu'à l'apex. Il a ainsi été montré que la myosine Myo2 n'était pas essentielle mais nécessaire pour la croissance polarisée des hyphes [44]. En présence de cytochalasine A (qui bloque spécifiquement la polymérisation des filaments d'actine), une croissance isotrope est observée sous la forme d'un bourgeon [42]. L'actine serait donc indispensable à la polarisation de la croissance des hyphes.

Les microtubules ont un rôle essentiel chez d'autres champignons filamenteux comme *N. crassa* ou *A. nidulans*. Ils sont responsables du transport des vésicules sur de longues distances le long du filament jusqu'au Spitzenkörper, et ceci grâce à des moteurs comme la kinésine [45].

Les filaments d'actine prennent ensuite le relais pour délivrer les vésicules à la membrane.

Cependant, leur rôle chez *C. albicans* est moins évident. En effet, plusieurs études présentent des résultats contradictoires quant à l'effet d'inhibiteurs de microtubules sur la croissance hyphale [46] [42]. Certaines suggèrent que la croissance polarisée ne dépendrait pas spécifiquement des microtubules [46]. Récemment, la voie de sécrétion chez *C. albicans* a été étudiée à l'aide de microscopie électronique 3D [32]. Contrairement à ce qui est connu chez d'autres organismes polarisés, le réticulum endoplasmique et le Golgi chez *C. albicans* avancent au cours de la croissance du filament. Cela réduit largement la distance à parcourir par les vésicules jusqu'au Spitzenkörper, distance qui serait parcourue le long de filaments d'actine. Ce nouveau modèle pour la croissance de *C. albicans* est représenté sur la figure 1.12.

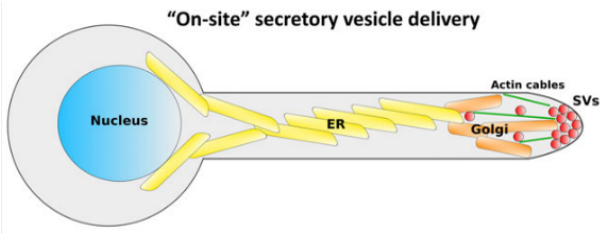


FIGURE 1.12 – Modèle pour la livraison des vésicules de sécrétion à l'apex [32] : les organites se déplacent le long de l'hyphe, ce qui permet un transport des vésicules de courte distance grâce à l'actine.

Vacuoles et branchements

Comme mentionné précédemment, les hyphes peuvent former des branchements. L'apparition de branches sur les filaments peut se produire de deux façons pour les champignons filamenteux. Le branchement apical consiste en une séparation de la pointe de l'hyphe en deux. Il est souvent observé pour des filaments à croissance rapide comme *Neurospora carassa* [47], alors que chez *C. albicans*, on observe uniquement un branchement latéral. Dans ce cas, des branches apparaissent à partir des compartiments sub-apicaux. Cela nécessite une nouvelle croissance polarisée avec tous les éléments mentionnés précédemment (transport de vésicules, nouveau Spitzenkörper etc). Le développement d'une nouvelle branche latérale n'aurait pas d'effet sur la croissance de l'hyphe principale [48].

La compréhension du choix des sites de branchement est encore très limitée. Cependant, de nombreux champignons comme *C. albicans* forment des branches juste en amont des septums (on voit un exemple sur la figure 1.4). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces sites de branchement [49]. Une première possibilité consiste à considérer le septum comme une sorte de barrière, qui bloquerait une partie des vésicules censées aller jusqu'à l'apex de l'hyphe [50]. Cela entraînerait leur accumulation juste avant le septum, et elles pourraient fusionner à la membrane générant ainsi une branche. Cependant, cette hypothèse est très discutée et il serait plus probable que certains composants intervenant dans la formation des septums seraient aussi impliqués dans la formation de branches [51].

Il semble également que l'émergence de branchements soit coordonnée avec le cycle cellulaire [52]. Cette corrélation peut s'expliquer par la présence de vacuoles dans les hyphes.

En effet, la croissance d'un tube germinatif à partir d'une levure se produit aussi grâce à l'augmentation en taille d'une vacuole dans la cellule mère ; la majeure partie du cytoplasme est ainsi poussée vers l'apex de l'hyphe ce qui induit une croissance continue. Ce même phénomène se produit au fur et à mesure que l'hyphe croît : la cellule mère et les compartiments sub-apicaux contiennent la majorité des vacuoles, tandis que l'article apical est composé essentiellement de cytoplasme, comme l'illustre la figure 1.13 [52].

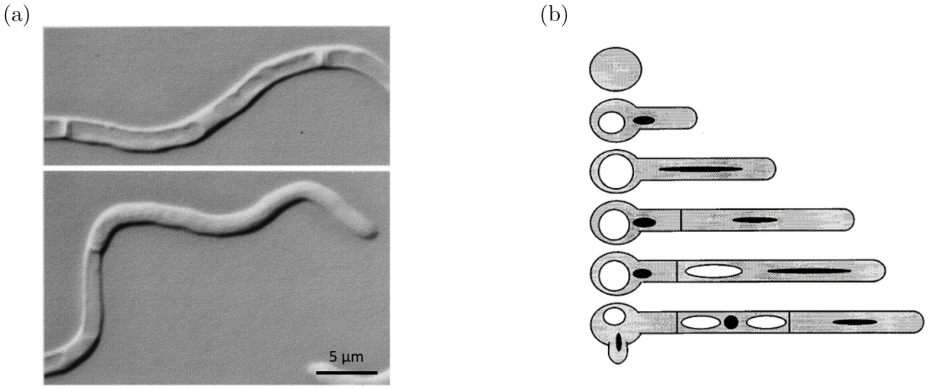


FIGURE 1.13 – Répartition asymétrique des vacuoles lors de la croissance hyphale : les vacuoles sont conservées dans les compartiments sub-apicaux, tandis que le cytoplasme va vers l'apex et permet la croissance hyphale [52]. (a) Images d'articles d'hyphes. En haut, un article sub-apical rempli de vacuoles et en bas, le compartiment à l'apex non vacuolé. (b) Représentation schématique.

Les compartiments en amont qui sont principalement remplis de vacuoles contiennent donc peu de cytoplasme. Ainsi leur volume effectif est faible (figure 1.14a), et cela entraîne un arrêt de leur croissance et du cycle cellulaire. Les détails du cycle cellulaire chez les hyphes seront discutés plus en détail dans un chapitre dédié.

La prise en compte de ce volume effectif pourrait expliquer la fréquence de branchement des hyphes [53]. En effet, le cycle cellulaire des articles sub-apicaux serait arrêté jusqu'à ce qu'ils atteignent un certain volume de cytoplasme, ce qui signifie que le volume de la vacuole diminue. Une nouvelle branche peut alors se former. La fréquence de branchement dépend donc de la vitesse à laquelle le compartiment augmente son volume cytoplasmique. Et ce paramètre lui-même est dépendant de la composition du milieu de culture. Par exemple, une concentration élevée en sérum augmente largement la fréquence de branchement par rapport à un milieu pauvre [52]. Le schéma en figure 1.14b illustre ce propos.

1.2.3 Mécanisme d'invasion

Comme expliqué plus haut, *C. albicans* sous forme levure est principalement présent dans le corps au niveau des muqueuses et dans le tube digestif. On a vu que *C. albicans* pouvait devenir un dangereux pathogène, et on va maintenant décrire les mécanismes d'invasion utilisés

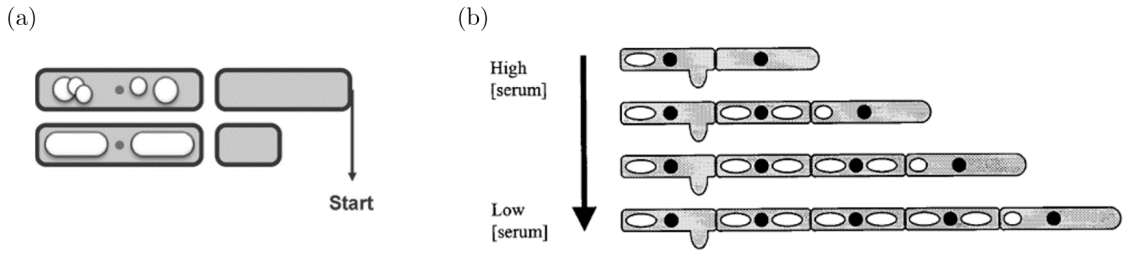


FIGURE 1.14 – Un article très vacuolé a un faible volume effectif, son cycle cellulaire et sa croissance sont à l'arrêt. La croissance et donc la formation d'une branche reprendraient lorsque ce volume effectif dépasse un certain niveau. (a) Volume effectif de cytoplasme dans un article [54]. (b) Effet du milieu sur la présence ou non de vacuoles et donc la fréquence de branchement [52].

qui donnent lieu aux candidoses invasives. Cependant, ces mécanismes restent encore assez peu connus, et on va essayer ici de donner un aperçu des connaissances dans ce domaine.

Le schéma sur la figure 1.15 représente l'invasion d'un tissu. Dans un premier temps, les levures vont adhérer à l'épithélium. Des hyphes vont ensuite se former, et ces filaments vont pouvoir pénétrer dans le tissu. Ensuite, lorsqu'ils atteignent l'écoulement sanguin, la dissémination dans le corps va se faire sous forme de levures, qui sont bien plus efficaces pour se disperser dans le sang. *C. albicans* va alors pouvoir envahir d'autres tissus et organes [25].

Les levures et les hyphes ont donc tous deux des rôles importants mais distincts : les hyphes sont invasives et les levures permettent la dissémination et la colonisation (via l'adhésion). Des études ont en effet souligné que des souches qui ne filamentent pas ne sont pas virulentes [55]. Plus précisément, sans présence de filaments, les souris infectées survivent mais une grande quantité de champignons est retrouvée dans les organes [56]. Les levures seraient donc tout de même capables de se disséminer dans l'organisme, mais les hyphes seraient seules responsables des dégâts causés aux tissus. Le suivi *in vivo* de ce mécanisme s'avère particulièrement difficile, mais une étude sur un poisson-zèbre a permis d'observer l'activité de ces différents morphotypes, confirmant le rôle d'invasion des hyphes et de dissémination des levures [57].

Adhésion sur l'épithélium

L'adhésion est un élément indispensable à la pathogénicité de ces champignons, nécessaire à l'invasion des tissus.

L'adhésion initiale passe en particulier par des interactions hydrophobes entre les levures et les cellules épithéliales, avec l'expression de protéines spécifiques hydrophobes à la surface des champignons [58]. La seconde étape implique les hyphes qui se forment après le contact initial, et les adhésines jouent ici un rôle essentiel. La composition de la paroi et notamment des protéines de surface comme les adhésines est différente selon la morphologie de *C. albicans*. On observe notamment une adhésion plus forte pour les filaments [58].

Les adhésines peuvent se lier à une grande variété de protéines, notamment des composants de la matrice extracellulaire des cellules hôtes (collagène, laminine, fibronectine, etc) ou des

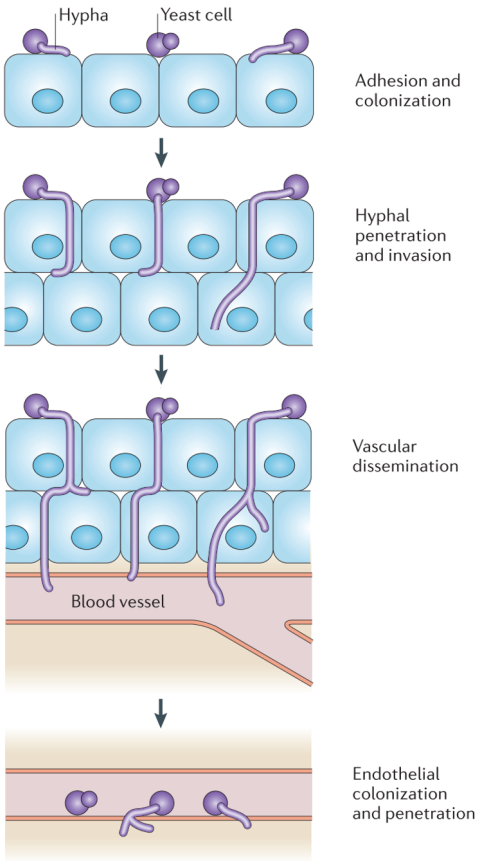


FIGURE 1.15 – Différentes étapes de l'invasion d'un tissu épithélial par *C. albicans* : adhésion à la surface, pénétration par les hyphes, dissémination dans le sang et colonisation d'autres tissus [25].

protéines de surface comme les cadhérines [59].

Les adhésines les plus étudiées sont celles de la famille Als (*agglutinin-like sequence*) qui sont attachées à la paroi cellulaire par des liaisons avec les β-glucanes. La protéine Als3 est un élément clé de l'efficacité d'invasion des hyphes, et son expression est effectivement bien plus élevée au cours des infections. Un mutant de délétion de Als3 voit son adhésion aux cellules significativement réduite et cela diminue ainsi indirectement l'efficacité d'invasion [60]. De la même façon, la protéine Hwp1 (*hyphal wall protein*) a un rôle indispensable dans l'infection car elle permet aux hyphes de s'attacher aux cellules de manière covalente.

Pénétration

La seconde étape représentée sur la figure 1.15 est la pénétration des hyphes dans le tissu. Deux méthodes principales ont été distinguées : un mécanisme passif d'endocytose, ou une pénétration active.

La méthode d'invasion semble dépendre du type d'épithélium rencontré. En effet, *C. albicans* pourrait envahir un tissu buccal par ces deux mécanismes, actif ou passif, tandis que l'invasion d'un tissu intestinal semble se produire uniquement de façon active [61].

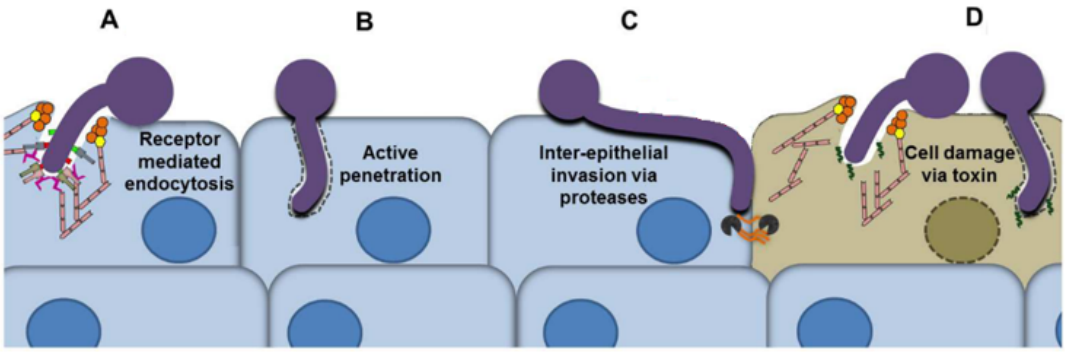


FIGURE 1.16 – Représentation schématique des types d'interactions possibles entre *C. albicans* et un tissu épithélial. (A) Endocytose passive des hyphes à l'intérieur des cellules, par l'intermédiaire des interactions entre protéines de surface (Als3 pour *C. albicans* et E-cadhérine pour la cellule). (B) Pénétration active des hyphes qui se fraient un chemin à travers la cellule. (C) Utilisation de protéases pour casser les jonctions adhérentes intercellulaires. (D) Utilisation de la toxine candidalysine pour détruire les cellules. (adapté de [62]).

Endocytose passive Les adhésines vont être à nouveau très importantes dans ce mécanisme : Als3 va pouvoir se lier aux E-cadhérines des cellules épithéliales, qui jouent un rôle essentiel dans l'adhésion intercellulaire des épithéliums [63] [59]. Cela va déclencher le mécanisme d'endocytose de la cellule, qui va ainsi entourer l'hyphe et l'internaliser. Il a été montré grâce à un mutant avec délétion du gène Als3 que cette adhésine était nécessaire pour l'attachement de l'hyphe aux cellules [59]. De plus, des billes avec un coating reproduisant la structure terminale de Als3 sont également endocytées dans les cellules, ce qui démontre le rôle de cette protéine. Ce processus ne requiert aucune contribution active de l'hyphe et est ainsi possible même avec des champignons morts.

Pénétration active Dans ce cas, *C. albicans* va envahir directement les cellules en utilisant à la fois ses propriétés mécaniques et la sécrétion d'enzymes. Cette invasion semble se produire parfois au niveau des interfaces entre cellules, mais plus fréquemment directement sur la face apicale d'une cellule [61]. Des exemples de ces deux situations sont représentés sur la figure 1.17.

La pénétration des cellules de l'hôte est rendue possible par les forces développées par les hyphes, qui sont de l'ordre du µN [64], ce qui est très important par rapport à celles que peuvent exercer des cellules animales (de l'ordre du pN). Un chapitre de cette thèse sera dédié à la caractérisation des propriétés mécaniques des hyphes.

Des enzymes sécrétées par le champignon contribuent aussi largement à l'invasion des tissus. *C. albicans* serait ainsi capable de sécréter plusieurs types d'hydrolases [65], qui auraient un rôle essentiel dans la dégradation des membranes cellulaires de l'hôte ainsi que des molécules de surface [66]. En particulier, les protéases dégradent les E-cadhérines et autres protéines de jonctions adhérentes, ce qui perturbe grandement l'intégrité du tissu épithélial et facilite l'invasion des hyphes [67]. Les protéases pourraient également permettre aux hyphes de se défendre contre le système immunitaire. Il a aussi été montré que les gènes codant pour ces protéases sont

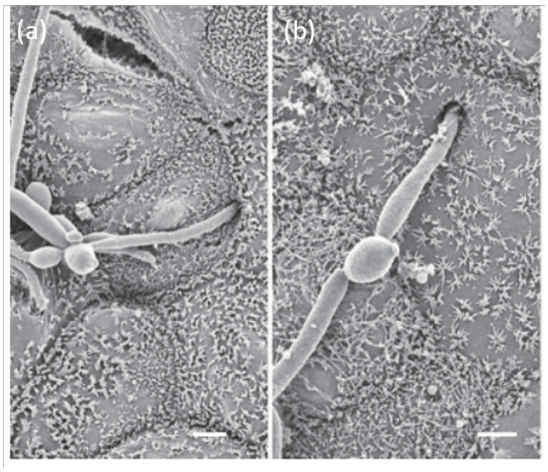


FIGURE 1.17 – Images de microscopie électronique à balayage montant la pénétration de *C. albicans* dans un tissu de cellules épithéliales Caco-2 (a) entre les cellules (b) directement dans une cellule [61].

fortement activés au cours de l'infection. L'absence de protéases sécrétées a pour conséquence une réduction notable de la capacité des hyphes à envahir les cellules épithéliales [61].

Récemment, une toxine produite par *C. albicans* a été découverte et appelée candidalysine [68]. Elle est sécrétée uniquement par la forme hyphale, et permet de perméabiliser les membranes. Plusieurs travaux ont déjà montré l'effet crucial de la candidalysine pour la dégradation des cellules et pour la translocation des hyphes à travers l'épithélium [68] [69]. En effet, la virulence d'un mutant avec une délétion du gène responsable de la candidalysine est atténuée.

1.2.4 Autres facteurs de virulence

Plusieurs facteurs de virulence viennent d'être détaillés pour expliquer le mécanisme d'invasion de *C. albicans*. Leur capacité à adhérer aux cellules, les transitions morphologiques, notamment entre levures et hyphes, ainsi que la sécrétion d'enzymes hydrolytiques ou de candidalysine jouent des rôles très importants dans la virulence. D'autres particularités de *C. albicans* lui permettent de se propager plus facilement dans le corps humain, comme sa capacité d'adaptation à l'environnement, sa résistance face au système immunitaire ou la formation de biofilms par exemple.

Biofilms

Un biofilm est une structure composée de micro-organismes qui adhèrent entre eux et à une surface et qui sont entourés de matrice extracellulaire. Dans le cas de *C. albicans*, la formation de biofilms est une source majeure d'infections puisqu'ils se développent aisément sur des dispositifs médicaux implantés comme des cathéters ou des prothèses, ou sur des muqueuses [70]. De plus, les biofilms sont généralement plus résistants aux antifongiques que de simple cultures en suspension, ce qui les rend d'autant plus dangereux. Il est possible de trouver des biofilms contenant plusieurs organismes différents, ce qui pourrait leur conférer des avantages en terme de résistance.

Les biofilms de *C. albicans* sont constitués à la fois de levures et d'hyphes, et plus rarement de pseudo-hyphes. La formation d'un biofilm est représentée sur la figure 1.18. En premier lieu, les levures adhèrent à un substrat et prolifèrent, puis des hyphes se développent et il y a production de matrice extracellulaire. L'étape de maturation du biofilm correspond à une augmentation globale de sa masse, avec la croissance des hyphes et la production de matrice. Enfin, une dernière étape consiste en une phase de dispersion où des levures sont relâchées dans le milieu environnant.

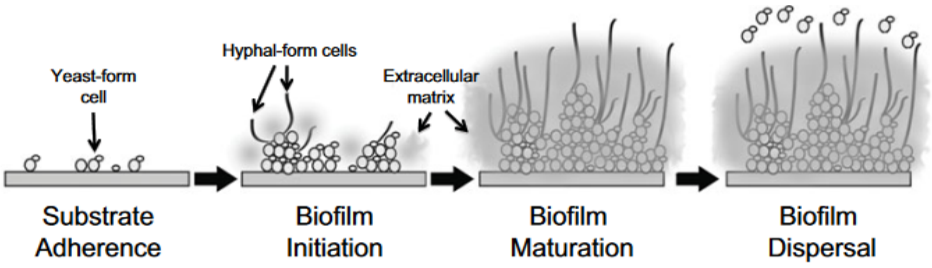


FIGURE 1.18 – Représentation schématique des différentes étapes du développement d'un biofilm [70].

Le mécanisme de résistance des biofilms aux antifongiques reste assez mal connu. Plusieurs hypothèses ont été avancées [70], notamment un problème de diffusion des traitements jusqu'aux cellules à cause de la matrice entourant le biofilm. Il pourrait également y avoir un changement de composition de la membrane des cellules composant le biofilm. Un point longtemps controversé concerne l'apparition de cellules persistantes [71]. Une étude récente a montré que ce phénomène n'est pas une caractéristique de *C. albicans*, et donc la persistance n'a sans doute pas de rôle significatif dans la résistance de ses biofilms [72].

Résistance au système immunitaire

Un facteur de virulence important est associé à la capacité de *C. albicans* à échapper au système immunitaire. En effet, ces pathogènes ont réussi à développer des mécanismes atténuant l'efficacité de la réponse de l'hôte.

La paroi cellulaire est la cible principale pour la reconnaissance par les cellules immunitaires de l'hôte. Cependant, on a vu que la composition de cette paroi est très dépendante des conditions de culture. Par conséquent, les réponses immunitaires sont différentes selon le milieu environnemental : un changement de source de carbone influence donc la production de signaux spécifiques des cellules immunitaires ainsi que l'efficacité de phagocytose [73]. De plus, la reconnaissance de ces pathogènes passe par des composants de la paroi comme le β-glucane qui peuvent être plus ou moins dissimulés sous la couche externe de mannanes [74].

C. albicans a développé des stratégies lui permettant d'échapper à la phagocytose. En effet, lorsqu'il se trouve à l'intérieur du macrophage, il fait preuve d'une résistance accrue face aux stress subis. Mais il peut aussi modifier le pH, sécréter des enzymes et faciliter la transition morphologique vers la forme filamenteuse. Les hyphes sont alors capables de percer la membrane du phagocyte pour s'en échapper [75]. On observe également des expulsions de *C. albicans* sans

lyse des macrophages, c'est-à-dire que les deux cellules restent intactes [76]. Ces différents types d'interactions avec les macrophages sont représentés sur la figure 1.19.

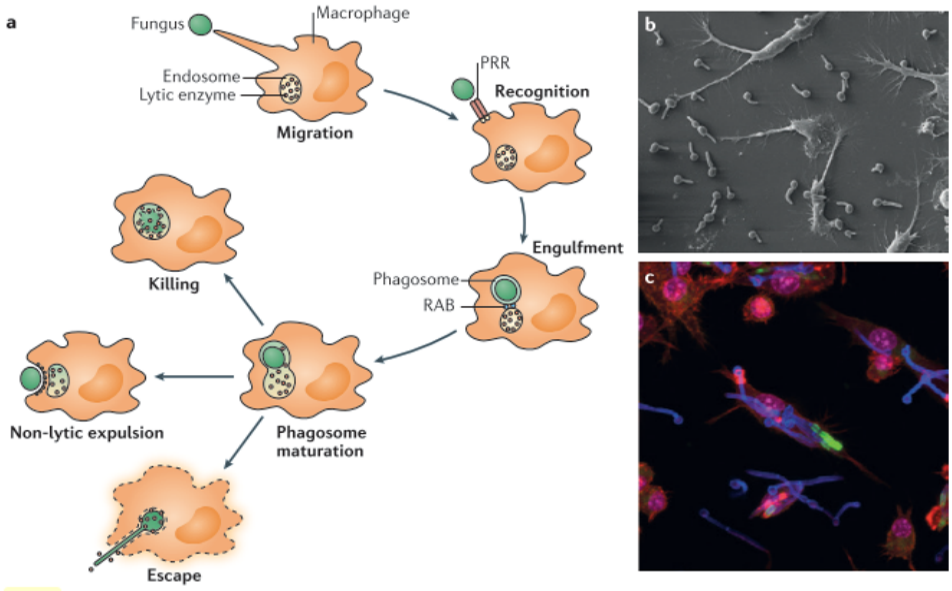


FIGURE 1.19 – Interactions entre les champignons et les macrophages [75]. (a) Représentation schématique de la phagocytose de la cellule suivie des différentes issues possibles à cette interaction : la mort du pathogène ou sa survie par expulsion ou filamentation. (b) Image de microscopie électronique à balayage (c) Image de microscopie confocale de *C. albicans* (en blue) phagocytés par des macrophages (en rouge).

Flexibilité du métabolisme et adaptation aux stress

C. albicans doit pouvoir s'adapter à des environnements très différents dans l'organisme, car il est capable d'envahir différents organes et de se propager dans le sang. Sa capacité d'adaptation à de nombreux stress contribue à sa virulence. En effet, l'inactivation de certains facteurs clés des voies de signalisation liées aux stress résulte en une atténuation de la virulence [77] [78].

Comme nous l'avons vu précédemment, les hyphes peuvent répondre par exemple à des chocs osmotiques. C'est également le cas pour des chocs thermiques ou des stress oxydatifs. Il existe aussi des mécanismes de résistance aux attaques sur la paroi dont la composition peut évoluer afin de maintenir l'intégrité de cette barrière.

Nous ne détaillerons pas ces mécanismes et les voies de signalisation liées au stress, mais ils peuvent être trouvés dans l'article [77].

Interactions avec le microbiote

Le microbiote environnant peut avoir différents effets sur la virulence de *C. albicans*, qui peuvent être positifs ou négatifs [79]. Nous avons déjà mentionné les potentielles interactions entre cellules dans un biofilm qui leur conféreraient une meilleure résistance aux traitements.

Au contraire, certaines bactéries empêchent la propagation et l'invasion de *C. albicans* sur des épithéliums (figure 1.20). Cela passe par de nombreux facteurs comme la compétition pour

des sites d'adhésion, la sécrétion de molécules spécifiques induisant la production de cellules immunitaires, ou encore la régulation du pH. La présence de ces bactéries et plus généralement d'un microbiote sain régule donc la croissance de *C. albicans* et le maintient sous sa forme commensale. Cela expliquerait l'effet néfaste de traitements antibiotiques lourds sur les infections fongiques.

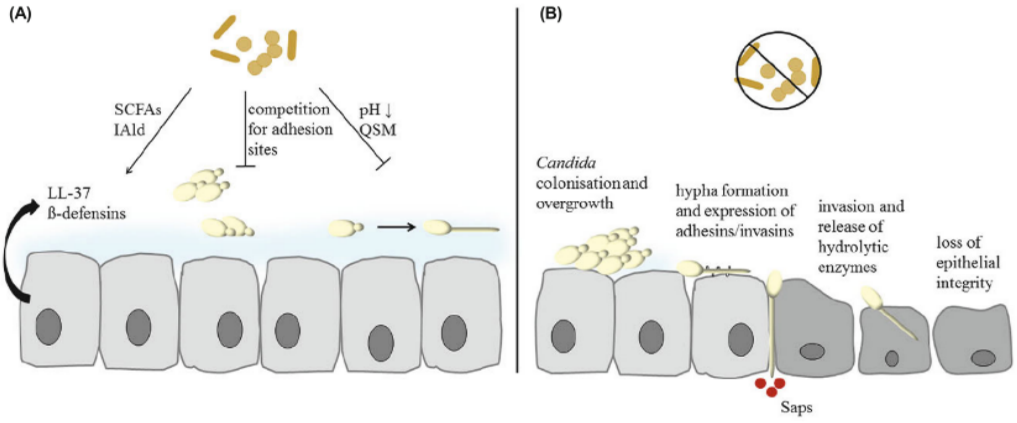


FIGURE 1.20 – Effet du microbiote sur la colonisation et l'infection de *C. albicans* [79]. (A) Dans un contexte de microbiote sain, des bactéries régulent la croissance des champignons par différents facteurs (B) Suite à un traitement antibiotique, le microbiote est perturbé : *C. albicans* est alors capable d'envahir l'épithélium.

1.2.5 Traitements antifongiques

Les infections liées aux champignons invasifs sont largement présentes, et nous allons voir ici quels sont les traitements possibles pour éradiquer ces pathogènes. Les premiers traitements antifongiques comme l'amphotéricine B sont apparus dans les années 1950. De nouvelles classes d'antifongiques ont ensuite été développées, jusqu'à la découverte dans les années 2000 des échinocandines. Malgré ces récents développements, les traitements antifongiques restent encore très limités. Les molécules recherchées doivent avoir un large spectre d'action sur différentes espèces de champignons. Une action fongicide, c'est-à-dire menant à la mort des cellules, est préférable à un effet fongistatique qui arrête seulement leur croissance. Il est également important de s'intéresser aux autres effets que ces traitements peuvent avoir sur l'hôte. De plus, de nombreuses résistances aux médicaments émergent, ce qui rend cette recherche de traitements encore plus cruciale.

Le schéma de la figure 1.21 représente les différentes cibles thérapeutiques explorées jusqu'à présent. Les cibles de chaque type d'antifongiques seront rapidement présentées ci-dessous, ainsi que les avantages et inconvénients de ces molécules thérapeutiques, à partir des informations extraites de cette revue [80].

Ces antifongiques sont utilisés pour tuer les cellules fongiques, mais une alternative pourrait être de cibler des facteurs de virulence que l'on a mentionnés dans la partie précédente. Par exemple, cibler la transition morphologique de *C. albicans* l'empêcherait de former des filaments

et réduirait par conséquent sa virulence et sa capacité à envahir les tissus [81].

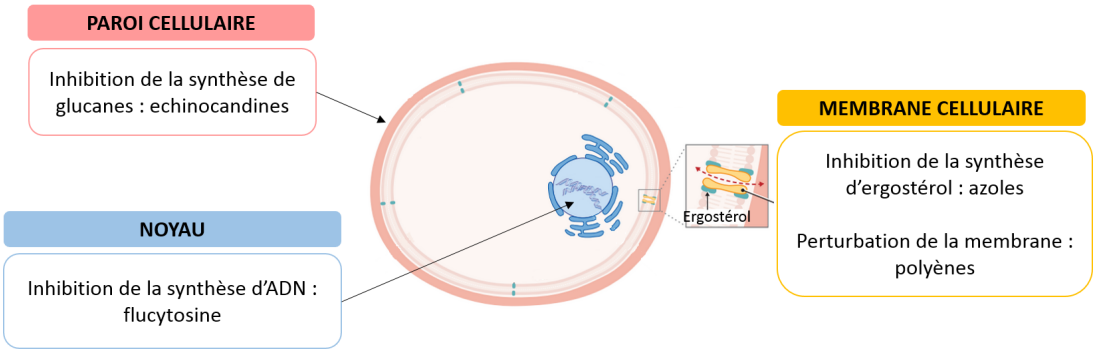


FIGURE 1.21 – Cibles des différents antifongiques : en particulier la synthèse d'ADN et d'ARN dans le noyau, d'ergostérol dans la membrane et de β-glucanes dans la paroi.

Noyau

La flucytosine est un analogue fluoré de la cytosine qui interfère avec la synthèse d'ADN et d'ARN dans le noyau et inhibe également la synthèse des protéines dans le cytoplasme [82]. Ce traitement doit souvent être utilisé en combinaison avec un autre antifongique, l'amphotéricine B, car il engendre une émergence rapide de résistance. Il est utilisé pour lutter contre des infections de *Candida* et de *Cryptococcus*.

Membrane

L'ergostérol est un composant de la membrane cellulaire des champignons qui est absent des cellules animales. Cela en fait donc une cible particulièrement intéressante pour les antifongiques.

L'amphotéricine B est un polyène qui se lie à l'ergostérol et perturbe ainsi l'intégrité de la membrane en y formant des pores, entraînant une perte de composants intracellulaires qui mène à la mort de la cellule. Il y a assez peu de résistance à cet antifongique, et il permet de traiter une large variété de champignons. Cependant, son usage est limité à cause de sa toxicité qui entraîne principalement des problèmes rénaux.

Les azoles perturbent la synthèse d'ergostérol, ce qui mène à une accumulation des précurseurs ainsi qu'à une réduction d'ergostérol dans la membrane. La composition de la membrane est alors modifiée et la croissance du champignon s'arrête. Contrairement à d'autres antifongiques comme les polyènes et les échinocandines qui ont pour conséquence la mort des cellules, les azoles ont uniquement une fonction fongistatique. Le fluconazole est très utilisé pour traiter les candidoses car il est relativement efficace, et bien toléré. Cependant, de plus en plus de résistances aux azoles émergent.

Paroi cellulaire

Les échinocandines sont une classe d'antifongiques découverte plus récemment qui inhibent une enzyme responsable de la synthèse de β-glucanes. Ces derniers sont un composant majeur

de la paroi cellulaire de la plupart des champignons pathogènes. La caspofungine fait partie de cette classe de médicaments.

Les nykkomycines sont aussi des antifongiques qui affectent la paroi : ils inhibent quant à eux la synthèse de chitine, un autre constituant essentiel de la paroi.

1.3 Utilisation de la microfluidique pour l'étude de systèmes biologiques

Après avoir présenté notre objet d'étude, nous allons maintenant parler de façon générale du choix de la microfluidique afin d'étudier ce type de système.

1.3.1 La microfluidique

Les technologies développées pour la fabrication de transistors ou de microprocesseurs dans les années 1950-1960 ont donné naissance au nouveau domaine de la microfluidique dans les années 90. La microfluidique correspond à la manipulation de liquides à petite échelle, de l'ordre du micromètre.

Au départ, la miniaturisation des systèmes se concentrait principalement sur les méthodes analytiques et avait pour objectif d'augmenter les performances de séparation de molécules. Cela a donc commencé par le développement de la chromatographie à échelle micrométrique [83] et de l'électrophorèse capillaire [84]. Mais les outils de la microélectronique ont permis à la microfluidique d'évoluer vers une discipline bien plus large que cela et touche désormais de nombreux domaines : chimie, biologie, protéomique, pharmacie, physique... (figure 1.22). Les applications sont très nombreuses, y compris dans notre vie quotidienne. Le premier produit utilisant la microfluidique à être commercialisé était l'imprimante à jet d'encre dans les années 1990, qui nécessite un contrôle du flux à petite échelle.

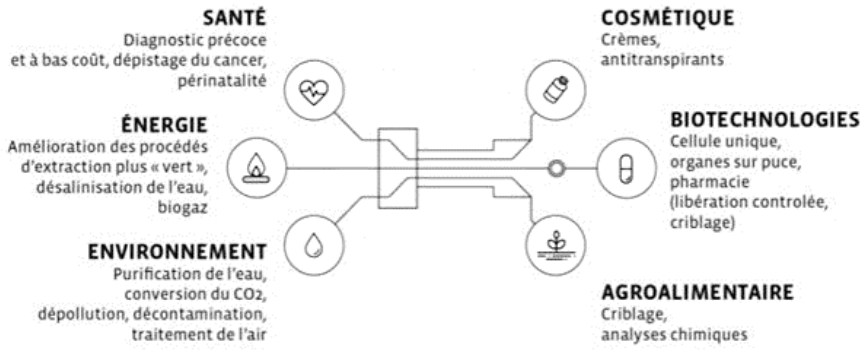


FIGURE 1.22 – Diversité des applications de la microfluidique (Source : https://www.institut-pgg.fr).

Le développement de la microfluidique a également mené à l'apparition des "laboratoires sur

puces" ou *lab-on-chip (LOC)*. Le but ultime est d'intégrer plusieurs étapes d'analyses dans une seule puce microfluidique. Une des premières puces dédiée à l'analyse d'ADN est représentée sur la figure 1.23 [85]. Elle est divisée en plusieurs compartiments permettant le mélange de plusieurs réactifs, l'amplification, la digestion de l'ADN, la séparation par électrophorèse et la détection par fluorescence. Ces dispositifs permettent donc de réduire l'intervention humaine et réduire le temps d'analyse et les volumes de réactifs.

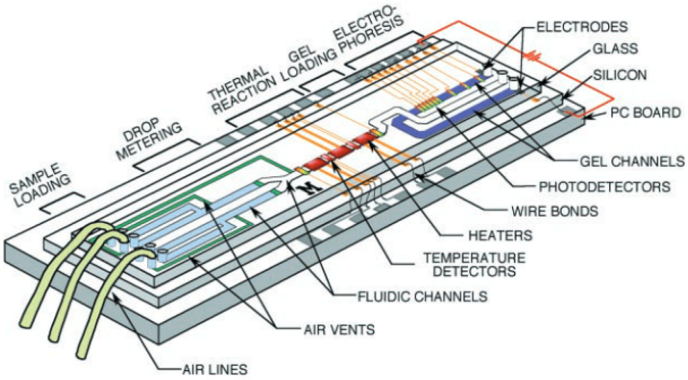


FIGURE 1.23 – Schéma d'une puce microfluidique pour l'analyse d'ADN contenant les différentes étapes généralement réalisées en laboratoire [85].

Ils peuvent aussi potentiellement donner lieu à des applications de *point of care*, c'est-à-dire des systèmes portables, à utilisation unique, faciles à utiliser et capables de traiter des échantillons bruts. Ces techniques sont particulièrement utiles pour le diagnostic de maladies qui pourrait alors se faire facilement à faible coût. C'est le cas notamment des tests de grossesse qui utilisent un échantillon d'urine ou plus récemment des tests sanguins pour le dépistage du VIH par exemple [86].

La microfluidique de gouttes (*droplet-based microfluidics*) offre de larges possibilités en terme d'analyses [87] [88]. Il s'agit de manipuler des gouttelettes de volumes très faibles : les générer, les mélanger, les trier, les fusionner et encapsuler des cellules à souhait. Les gouttes sont ainsi considérées comme des micro-réacteurs et peuvent servir comme on l'a vu plus haut à l'analyse de constituants biologiques, ADN, ARN, protéines.

Plus récemment, des organes sur puce se sont aussi développés [89] [90] [91]. Cela consiste à essayer de reproduire la complexité des organes dans des dispositifs miniaturisés. Les outils de microfabrication permettent en effet de produire des structures bien particulières comme celles de l'intestin par exemple avec des villosités. Il est également possible de recréer la vascularisation au sein des organes à l'aide de flux. Ces technologies pourraient à terme permettre d'améliorer notre compréhension du fonctionnement de ces organes ou de certaines maladies ainsi que de tester de nouveaux médicaments.

1.3.2 Intérêt pour les systèmes biologiques

La microfluidique présente de nombreux avantages pour la culture cellulaire et l'étude d'organismes biologiques.

Utilisation de très faibles volumes

Les volumes utilisés sont en effet très faibles, de l'ordre du µL voire du nL ou pL lorsque l'on parle de microfluidique en gouttes. Cet aspect est particulièrement utile en chimie ou biologie car les réactifs peuvent être très couteux ou les échantillons limités. Cela contribue donc à réduire les coûts de chaque expérience. De plus, dans une puce microfluidique, un faible nombre de cellules est suffisant, ce qui est nécessaire lorsque des échantillons de patients sont analysés par exemple. Étant donné le faible volume, on peut atteindre une plus grande densité qu'en culture classique.

La microfluidique de gouttes est particulièrement représentative de l'utilisation de faibles volumes et de haut débit. On peut ainsi l'utiliser pour effectuer un criblage de certaines propriétés. Une étude a par exemple trié des champignons filamenteux sur la base de leur activité enzymatique grâce à un système de gouttes [92].

Contrôle complet de l'environnement

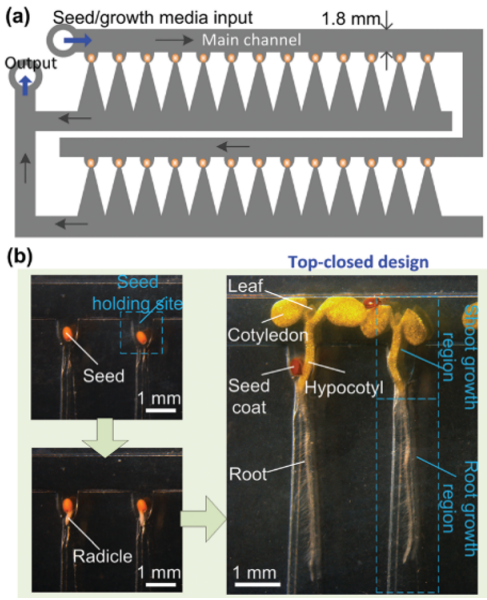
Les dimensions et géométries des canaux, la composition exacte du milieu ainsi que la température du système sont en effet des paramètres facilement contrôlables en microfluidique.

Le fait de pouvoir choisir complètement le design de la puce en fait un outil très flexible et adaptable. Il est possible d'imaginer de nombreux dispositifs pour étudier tous types de cellules. Bien que les cellules animales constituent pour le moment l'objet d'étude privilégié de la microfluidique, des systèmes ont été développés pour répondre aux questions spécifiques à d'autres organismes. C'est le cas par exemple des plantes, dont la morphologie très différente des cellules animales requiert des dispositifs particuliers. Quelques exemples ayant servi à la culture de plantes et à l'étude de leur croissance et métabolisme sont représentés sur la figure 1.24 [93] [94].

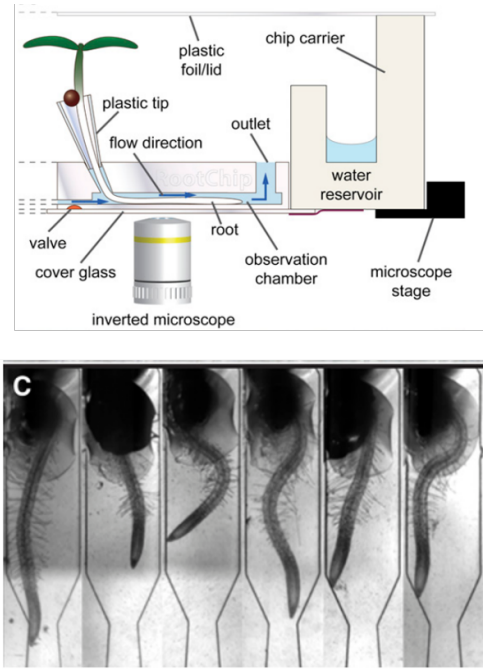
Il est également important de pouvoir contrôler les écoulements dans les puces pour effectuer par exemple des rinçages, un apport continu de nutriments ou un changement de conditions expérimentales. Étant donné les petites échelles auxquelles on se place, le système se situe à faible nombre de Reynolds. Cela signifie que les écoulements sont laminaires et non pas turbulents. Il n'y a donc pas de mélanges de liquides par convection, mais uniquement par diffusion. De cette façon, on peut aussi établir des gradients chimiques à l'intérieur des puces [95]. Des gradients statiques ou avec flux laminaires peuvent ainsi être produits dans les puces. Cela permet notamment d'étudier le chimiotropisme ou la chimiotaxie des cellules, c'est-à-dire leur capacité à se réorienter ou migrer vers des chimioattractants. Plusieurs études en ce sens ont par exemple été réalisées pour des tubes de pollen [96] [97].

Parallélisation des expériences

Le fait de pouvoir positionner de nombreux canaux en parallèle dans chaque puce facilite l'acquisition d'une grande quantité de données. De plus, les puces sont généralement assez faciles à produire.



(a) Schéma et images d'une puce pour l'ensemencement de graines et l'étude de la croissance de plantes [93]



(b) Schéma et images des microcanaux dédiés à l'étude des racines de plantes (dispositif appelé *RootChip*) [94]

FIGURE 1.24 – Systèmes ayant été développés spécifiquement pour répondre aux questions liées à la croissance de plantes.

Imagerie en live et tracking

Les puces microfluidiques sont très souvent réalisées dans un polymère transparent (le PDMS dont on reparlera dans la suite), ce qui permet de suivre l'évolution du système au cours du temps.

Isolation et compartimentalisation

Ce type de système représente également une grande avancée dans l'étude de cellules individuelles, et non pas seulement des effets de populations. Les analyses de cellules uniques sont permises grâce à l'encapsulation d'une cellule dans une goutte. Et plus largement, de nombreuses stratégies sont développées pour étudier des organismes biologiques de façon individuelle. Il est en effet facile d'adapter le design de la puce aux particularités de l'objet d'étude. La microfluidique permet également d'avoir une compartimentalisation, c'est-à-dire de pouvoir isoler plusieurs chambres et donc d'y appliquer des traitements différents. Ce principe est illustré par exemple pour la culture de neurones sur la figure 1.25 [98]. En isolant deux compartiments séparés par des microcanaux, il est possible de manipuler de façon indépendante d'une part les axones et d'autre part les somas. Cela peut également servir à l'étude de systèmes plus complexes impliquant plusieurs types de cellules par exemple.

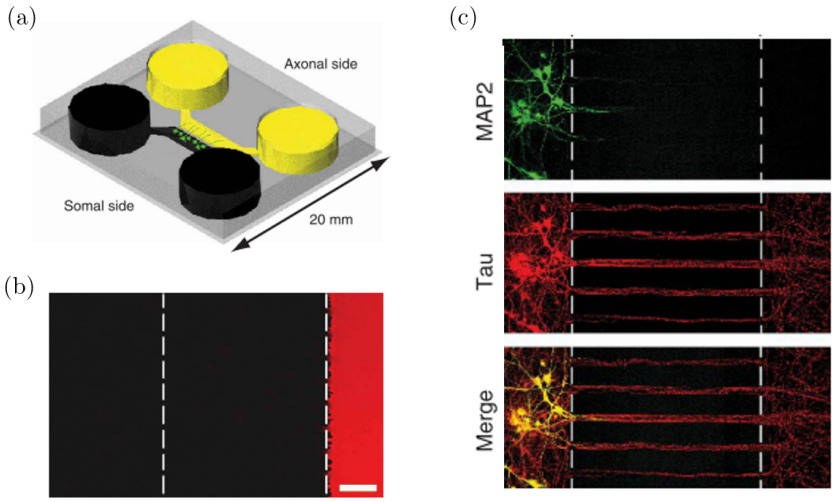


FIGURE 1.25 – Exemple de compartimentalisation dans un puce microfluidique [98]. (a)(b) Schéma et image de microscopie à fluorescence de l'isolation fluidique de deux compartiments séparés par des microcanaux : un milieu fluorescent est incubé dans le compartiment de droite et ne diffuse pas de l'autre côté. (c) Isolation des axones (en rouge) dans le canal de droite tandis que les somas et dendrites (en vert) restent à gauche.

1.4 Objectifs du projet

Nous avons donc vu que la forme hyphale de *C. albicans* est essentielle à sa virulence car elle permet l'invasion des barrières épithéliales. Au-delà du mécanisme d'endocytose passive et de la sécrétion d'enzymes, l'aspect mécanique de la pénétration des tissus est une composante majeure de la pénétration active, à laquelle nous avons choisi de nous intéresser.

Comme nous l'avons vu, le développement de la microfluidique ouvre de nouvelles perspectives très intéressantes pour étudier des systèmes biologiques. Cet outil semble être particulièrement adapté au guidage des hyphes de façon individuelle dans des microcanaux, contrairement à ce que l'on peut observer *in vivo* ou pour des cultures standard *in vitro*. Dans un premier temps, nous avons donc réalisé un design de puces microfluidiques permettant l'isolement et le guidage des hyphes, tout en disposant de nombreux microcanaux en parallèle. Ce design sera adapté pour les différentes questions que nous traiterons.

Tout d'abord, les propriétés mécaniques de ces filaments constituent un enjeu majeur, puisqu'une hyphe ayant une rigidité plus faible ou exerçant des forces plus faibles aura très probablement une virulence réduite. Ainsi, mesurer leurs caractéristiques mécaniques s'avère particulièrement intéressant, d'un point de vue biophysique pour mieux comprendre cet organisme, mais également du point de vue de sa pathogénicité. Nous avons donc choisi de développer une méthode microfluidique permettant la mesure du module de flexion ainsi que du module de Young de la paroi rigide des hyphes. Pour cela, les filaments sont soumis à un flux transverse qui induit leur flexion. Nous avons effectué ces analyses dans plusieurs conditions de culture, et notamment en présence d'un agent antifongique, afin de préciser son mode d'action. Nous avons par ailleurs étudié différents mutants pour évaluer leur contribution au maintien de la

rigidité pariétale. En parallèle, nous avons commencé à développer un dispositif plus complexe de mesure de force exercée par l'hyphe, qui permettrait à l'utilisateur d'avoir une action directe sur la force résistive appliquée face à l'hyphe.

L'aspect mécanique de l'invasion des tissus ne se limite pas uniquement à la nécessité d'exercer des forces importantes ou d'avoir une rigidité suffisante, mais cela implique aussi la croissance des hyphes dans différents environnements complexes. Ainsi, on peut s'attendre à ce que la croissance dans un épithélium ou dans la matrice extracellulaire, c'est-à-dire en situation de confinement, soit différente de la croissance en milieu liquide par exemple. Étant donné que peu d'études *in vivo* permettent d'analyser précisément le comportement des hyphes dans ces conditions, nous nous proposons ici d'étudier l'influence d'un environnement confiné *in vitro* et contrôlé, sur la croissance des hyphes. Nous commencerons par nous intéresser à un confinement 3D dans un gel pour nous concentrer ensuite sur des confinements 2D dont la géométrie est précisément contrôlée grâce aux outils de microfabrication. Des trajectoires de croissance sinusoïdales sont alors observées et soulèvent de nombreuses questions concernant les conditions d'observations de ce comportement, l'origine de ces oscillations ou encore l'intérêt biologique de cette croissance sinusoïdale ou hélicoïdale.

Enfin, nous avons vu que les hyphes de *C. albicans* ne sont pas des organismes unicellulaires contrairement aux levures. Cette caractéristique les rend particulièrement intéressant d'un point de vue biophysique car on peut alors envisager de considérer ces hyphes comme un nouvel organisme modèle, différent des autres organismes souvent étudiés. En observant la dynamique de déplacement des noyaux au sein de ces filaments, ainsi que d'apparition des anneaux de septine, nous avons pu observé la coordination entre le cycle cellulaire des hyphes et leur croissance. Tandis que les cycles cellulaires des bactéries et levures telles que *S. cerevisiae* ou *S. pombe* ont été largement étudiés, celui de *C. albicans* n'a pas été analysé à notre connaissance. On peut alors se demander si le cycle cellulaire des hyphes est régulé en taille (au niveau des articles) et dans ce cas, si cette régulation est similaire pour les deux morphotypes du même organisme que sont les levures et les hyphes.

Ces trois aspects font l'objet des trois chapitres de résultats de ma thèse. Du fait des particularités des questions abordées, chaque chapitre débutera par une introduction plus spécifique. Ce manuscrit intègre également, avant la présentation des résultats, un chapitre dédié aux méthologies utilisées et développées.

CHAPITRE 2

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Je n'ai pas échoué. J'ai simplement trouvé 10 000 solutions qui ne fonctionnent pas.

Thomas Edison

Ce chapitre a pour objectif de détailler les méthodes expérimentales utilisées et développées pour notre étude, en terme de fabrication et optimisation des puces microfluidiques ainsi que de culture et transformation de *C. albicans*.

2.1 Microfabrication

La microélectronique et les microsystèmes électromécaniques (MEMS) se sont particulièrement développés à partir des années 1970. Ils reposent sur la miniaturisation et donc la microfabrication. Dans les années 1990, la diversification de ces microsystèmes a donné naissance au domaine de la microfluidique qui s'appuie sur ces mêmes principes de fabrication pour créer des structures et canaux à échelle micrométrique. Les procédés généraux de microfabrication que l'on a utilisés pour la réalisation des puces nécessaires à cette étude seront explicités ici.

2.1.1 Design global des puces

La première étape consiste à réaliser le design des puces. Le logiciel Clewin est utilisé pour la réalisation des dessins des masques. Certaines spécificités des designs seront détaillées par la suite, notamment la façon de positionner les levures afin de maximiser le nombre d'hyphes dans les canaux. Globalement, on souhaite utiliser des canaux à l'échelle micrométrique de façon à isoler et guider les hyphes.

Vue d'ensemble des puces

On peut voir une représentation schématique d'une puce utilisée sur la figure A.1a. Elle inclut un grand canal central d'environ 30 µm de hauteur dédié à l'ensemencement des levures,

qui constitue aussi un réservoir de milieu de culture. Des microcanaux sont placés de part et d'autre de cette grande chambre. Un serpentin, donc la fonction sera explicitée plus bas, ainsi que des inlets et outlets complètent ce dessin général. Des images de ces structures ont également été prises au microscope électronique à balayage (MEB) pour mieux rendre compte de la configuration (figure 2.1b).

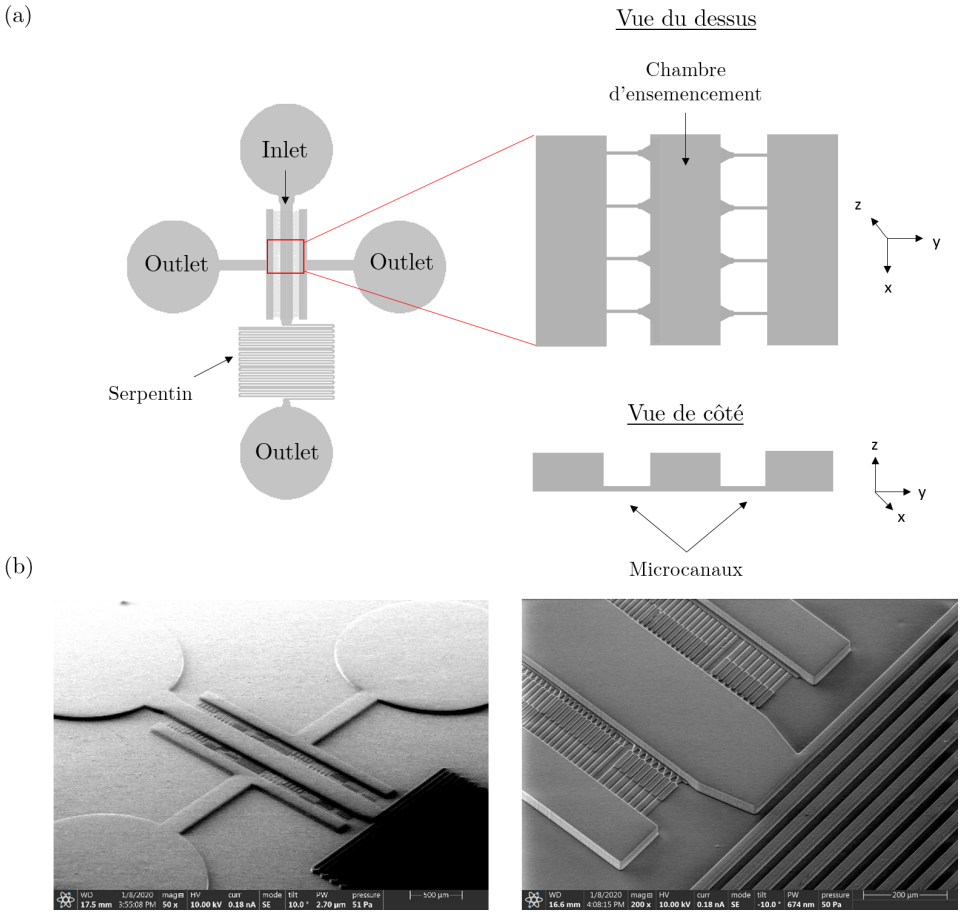


FIGURE 2.1 – Exemple de puces utilisées. (a) Schéma représentatif sur lequel on voit la structure globale de la puce constituée d'une entrée dédiée à l'ensemencement des levures, et de 3 sorties. Le canal central d'ensemencement dessert des microcanaux de faibles dimensions de part et d'autre. (b) Images de microscopie électronique à balayage (MEB) d'un moule, où l'on distingue les microcanaux ainsi que les chambres de plus grande hauteur (Olivier Lesage).

Micro-canaux

Dans le but de suivre leur croissance, on utilisera des microcanaux de hauteur proche du diamètre de l'hyphe, qui permettront aux filaments de rester dans le même plan focal au cours du temps. La géométrie des canaux variera selon les expériences, mais on utilisera généralement une hauteur variant entre 1 et 3 µm et une largeur entre 1 et 40 µm. La longueur des microcanaux a été fixée à environ 150 µm.

Il est important de noter qu'un simple canal de 2 µm de haut et de 40 µm de large ne peut être réalisé sans l'ajout régulier de piliers. En effet, une telle structure a un rapport d'aspect beaucoup

trop faible et le plafond du canal s'effondrerait s'il n'est pas maintenu. On ajoutera dans ce cas des piliers de 3 µm de diamètre espacés régulièrement de 12 µm. Ces paramètres se sont avérés efficaces expérimentalement (pour une étude systématique de ce phénomène d'effondrement du plafond de PDMS et des solutions possibles, se référer à [99]).

Une puce contient entre 60 et 200 microcanaux en parallèle, ce qui permet d'augmenter la quantité de données obtenues à chaque expérience.

2.1.2 Fabrication des moules

Principe

La photolithographie consiste à transférer des motifs présents sur un masque vers une résine photosensible déposée sur un substrat. Cette opération se déroule en salle blanche, pièce dans laquelle la quantité de particules dans l'air est limitée et avec un éclairage ne contenant pas d'ultraviolets.

Les moules utilisés pour fabriquer les puces microfluidiques sont réalisés sur des wafers de silicium.

La première étape consiste à étaler une résine photosensible SU-8 (MicroChem) sur ce wafer (figure 2.2a). Cela s'effectue grâce à une étape de *spin coating* (ou enduction centrifuge) : la résine est déposée sur le substrat qui est maintenu par du vide sur un plateau tournant à très grande vitesse. Cela permet d'étaler cette résine par force centrifuge et d'obtenir de fines couches homogènes. La viscosité de la résine ainsi que la vitesse de rotation sont choisies de façon à obtenir l'épaisseur de résine souhaitée, correspondant à la hauteur de canaux souhaitée. L'ensemble est ensuite placé sur une plaque chauffante (étape de *soft-bake*) pour éliminer une partie des solvants.

La résine est alors exposée aux UV, soit à travers un masque, soit grâce à un laser (figure 2.2b). Ces deux méthodes et leurs avantages et inconvénients seront détaillés dans la partie suivante. L'exposition aux UV de la résine photosensible va entraîner des modifications chimiques. Celle que nous utilisons est négative, ce qui signifie qu'elle réticule lorsqu'elle est insolée. La partie exposée va donc se rigidifier tandis que l'autre partie restera soluble dans la solution de développeur.

Après insolation, le wafer est à nouveau chauffé à 95°C, puis placé dans ce développeur (PGMEA, MicroChem) pour enlever la résine non réticulée (figure 2.2c). On obtient finalement le design choisi en relief sur le substrat.

Le même processus peut être répété en déposant une nouvelle couche de résine, afin d'obtenir un second niveau de motifs. On peut ainsi obtenir des canaux de plus grande hauteur.

Comparaison des différentes techniques

L'exposition aux UV peut donc se faire de 2 façons différentes, illustrées en figure 2.3 :

- à travers un masque (2.3a) : un masque en chrome (dont la fabrication est expliquée dans la partie suivante) comprend des zones transparentes correspondant au motif des canaux et qui laissent passer la lumière. Dans ce cas, lors de l'insolation, le masque est placé en contact avec

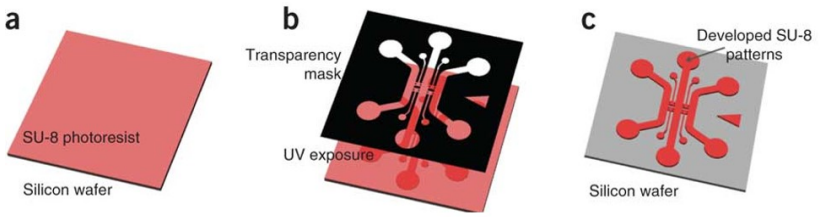


FIGURE 2.2 – Schéma représentant les différentes étapes de la photolithographie.

le wafer et la résine dans le but de limiter au maximum les effets de diffraction. En effet, la diffraction des rayons UV représente la principale limitation de cette méthode. Elle ne permet pas ainsi de descendre à des tailles de traits inférieurs à 1 µm. Un exemple de résultat obtenu avec cette technique est illustré sur la figure 2.3c. On constate qu'il est assez difficile d'obtenir des canaux sinusoidaux de 2 ou 3 µm de large, alors qu'on peut réaliser des canaux droits de cette largeur. Il est possible d'améliorer un peu ces résultats en effectuant un *edge bead removal* (figure 2.3d). Lors du spin-coating de la résine, l'épaisseur est homogène au centre du wafer, mais une accumulation de résine se forme au niveau des bords. Cela a pour conséquence d'empêcher le bon contact entre la résine et le masque, nécessaire à l'obtention de structures finement résolues. Ce *edge bead removal* consiste donc à enlever à l'aide d'un solvant la résine aux bords.

- lithographie directe par laser (2.3b) : au lieu d'exposer l'intégralité du wafer à travers un masque, cette technique consiste à venir balayer ligne par ligne le wafer avec un laser, qui s'allume et s'éteint selon le motif choisi. Ainsi la résolution va principalement dépendre du faisceau du laser utilisé. De plus, comme on peut le constater sur les images de la figure 2.3e, cela nous permet d'obtenir des parois nettement plus lisses. Il faut toutefois noter que cette méthode de balayage, bien que plus précise, nécessite un temps d'exposition beaucoup plus long.

Nous avons effectué des premiers tests de lithographie laser avec une Dilase 650 (Kloe). Cet appareil permet, comme nous venons de le préciser, d'obtenir des résultats de canaux de 2 µm de large de très bonne résolution avec des parois non rugueuses. Elle permet également d'atteindre des rapports d'aspects très grands grâce à un système optique où la zone de focalisation du laser est relativement grande. Cependant, cet outil ne sera pas utilisé par la suite car, ne possédant pas d'autofocus, l'obtention d'un motif reproductible s'est avérée très compliquée (entre plusieurs wafers ou sur un même wafer, d'un bord à l'autre).

La μPG 501 (Heidelberg), quand à elle, nous a permis d'obtenir des résultats très satisfaisants, tant au niveau de la résolution (en descendant jusqu'à 1 µm) que de la reproductibilité. Cependant, elle ne permet pas d'insoler correctement en écriture directe des résines d'épaisseur supérieure à 6 µm, mais cela nous convient parfaitement pour la réalisation de nos microcanaux (dont la hauteur varie entre 1 et 5 µm).

Réalisation d'un masque en chrome

Les masques en chrome sont également réalisés par écriture directe au laser (μPG 501, Heidelberg). Le principe est représenté sur la figure 2.4. Le masque est au départ constitué de verre, d'une couche de chrome (en noir) et d'une couche de résine photosensible (en jaune).

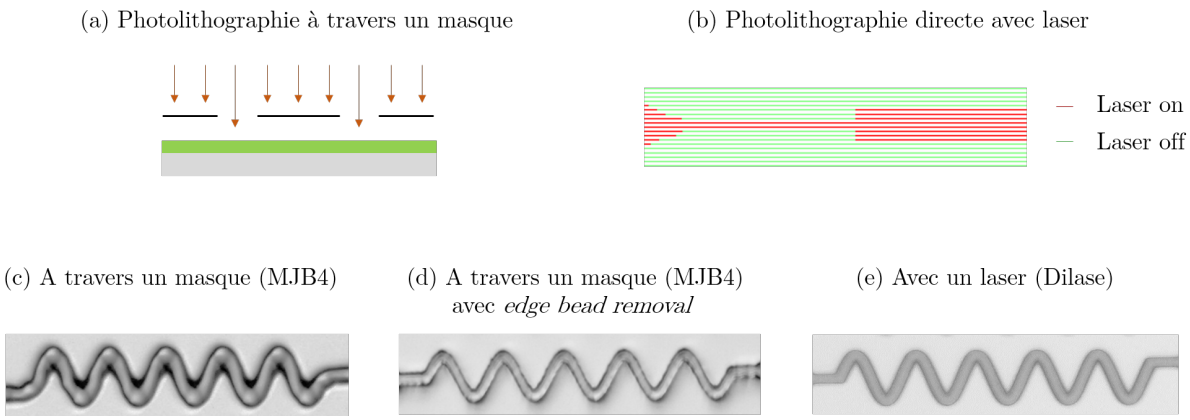


FIGURE 2.3 – Principe des méthodes de photolithographie utilisées et comparaison des résultats obtenus (microcanaux de 3 μm de large). (a) Photolithographie à travers un masque (MJB4) : la résine est exposée aux UV à travers un masque. (b)Photolithographie directe avec laser (Dilase ou μPG) : la résine est exposée aux UV à l'aide d'un laser qui balaie la zone d'intérêt. (c) A travers un masque (MJB4). (d) A travers un masque (MJB4) avec *edge bead removal*. (e) Avec un laser (Dilase). On note la limite de la lithographie avec masque pour des faibles dimensions, et une amélioration en utilisant le *edge bead removal*, tandis que la lithographie laser produit des structures très nettes.

Celle-ci est cette fois positive, ce sont donc les parties exposées aux UV (en rouge) qui vont être solubles dans le développeur (AZ351B, Microchemicals). A ces endroits là, le chrome est alors accessible, et une étape de *chrome etching* permet de l'enlever également. Il ne reste alors plus qu'à enlever toute la résine avec de l'acétone pour obtenir finalement le masque en chrome, avec les zones transparentes correspondant au motif souhaité.

Alignement

Comme décrit précédemment, nos puces sont composées de canaux de 2 hauteurs différentes. Pour cela, une première étape de lithographie est réalisée pour les microcanaux de plus faible épaisseur. Ensuite une seconde couche de résine est étalée sur le wafer contenant les premières structures, et une étape d'alignement est nécessaire pour obtenir la puce finale. Cela est effectué grâce à des croix d'alignement sur chacun des deux designs (représentées en annexe A), qu'il faut aligner à l'aide d'un microscope installé sur l'aligneuse (MJB4, SUSS MicroTec).

Nous réalisons la première couche à l'aide de lithographie directe laser (μPG) pour obtenir des microcanaux à faibles dimensions bien résolus, tandis que la deuxième est réalisée grâce à un masque en chrome préalablement fabriqué. L'alignement se fait en déplaçant le wafer jusqu'à superposer les croix d'alignement présentes sur le wafer et sur le masque en chrome. Cette opération se fait juste avant de les mettre en contact pour l'exposition aux UV. Il y a donc là un risque de décalage des motifs, en plus du fait que l'alignement se fait à l'oeil et manuellement. C'est pour cette raison que l'on garde généralement une marge d'erreur (de l'ordre de 10 à 20 µm) lors de la conception du design, pour être sûr d'avoir une bonne superposition des 2 motifs.

Dans un cas particulier dont nous parlerons dans le chapitre 4, nous avons eu besoin de micro-

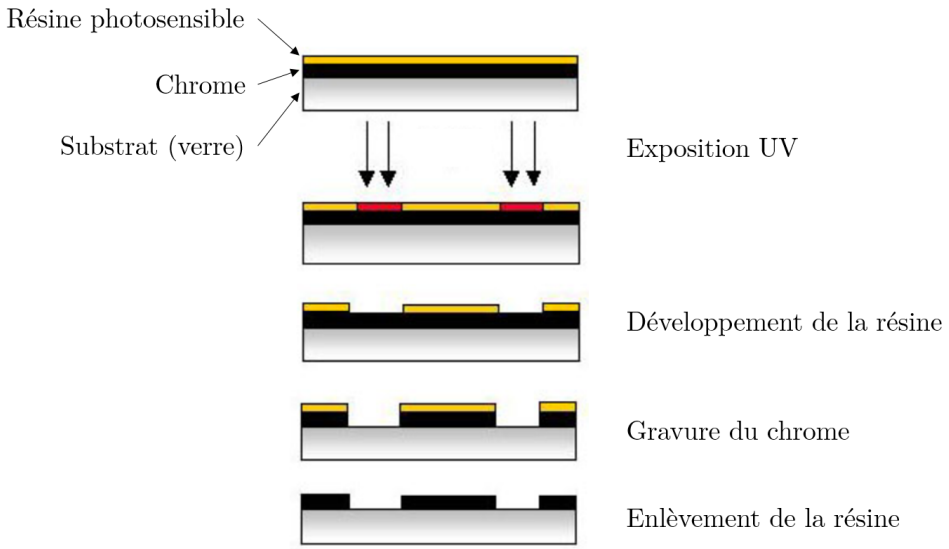


FIGURE 2.4 – Schéma représentant les différentes étapes de la réalisation d'un masque en chrome.

canaux eux aussi à 2 niveaux afin d'étudier précisément l'effet du confinement et du relâchement de cette contrainte physique, c'est-à-dire une première couche de 1.5 µm de hauteur et une seconde à 6 µm (en plus de celle à 30 µm). Cela signifie fabriquer des microcanaux de 10 µm de largeur avec une alternance de hauteur. Cela représente un challenge important puisqu'il s'agit d'avoir un alignement entre les 2 niveaux quasi-parfait. A cause de l'erreur d'alignement discuté précédemment, on ne peut donc pas utiliser cette même technique. On a donc expérimenté la méthode d'alignement proposé par la μPG. Le principe est exactement le même, mais cette fois, après un positionnement grossier de la part de l'utilisateur, l'appareil va détecter automatiquement le centre des croix pour venir aligner très précisément la seconde couche. Les résultats obtenus sont très prometteurs quant à l'utilisation de cette machine pour des alignements précis. On peut en effet observer sur la figure 4.28 les microcanaux à 2 niveaux parfaitement alignés. Les designs utilisés pour réaliser cette puce avec les 3 niveaux peuvent être trouvés en annexe A.

2.1.3 Soft lithographie

Cette étape consiste à transférer les motifs du wafer vers des puces en PDMS qui contiendront alors les canaux.

Silanisation

La silanisation permet d'empêcher l'adhésion du PDMS au wafer, qui pourrait lors de l'étape de transfert détruire les structures présentes à la surface. Le wafer subit d'abord un traitement plasma qui active la surface en créant des groupes hydroxy. Le silane (trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane) est ensuite déposé par vapeur. Des liaisons O-Si-O sont alors créées comme indiqué sur la figure 2.6. Une seule silanisation est normalement suffisante, même si le wafer est réutilisé plusieurs fois.

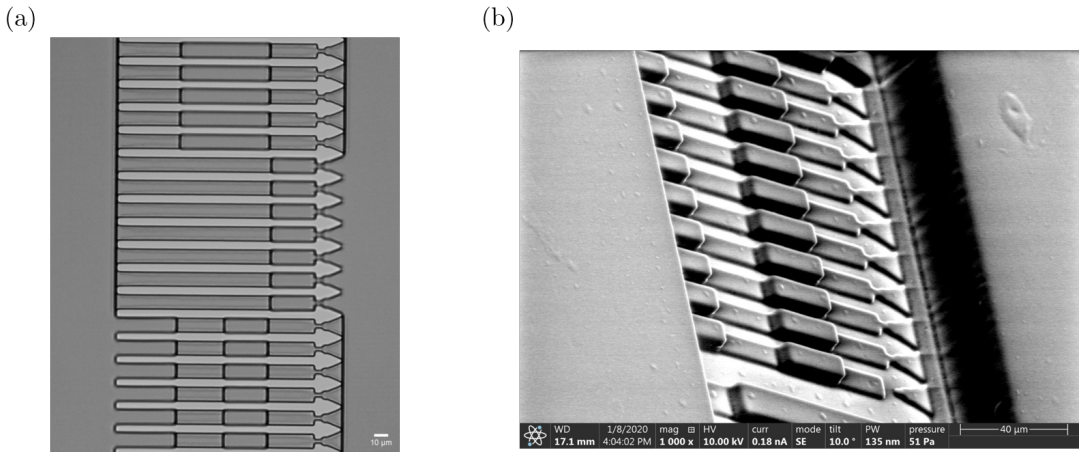


FIGURE 2.5 – Images du moule contenant des microcanaux de 10 µm de large et à 2 hauteurs (1.5 µm et 6.5 µm). (a) Image vue de dessus, les zones noires sont les sauts de hauteur. (b) Image de microscopie électronique à balayage (MEB) sur laquelle on distingue bien les deux épaisseurs (Olivier Lesage).

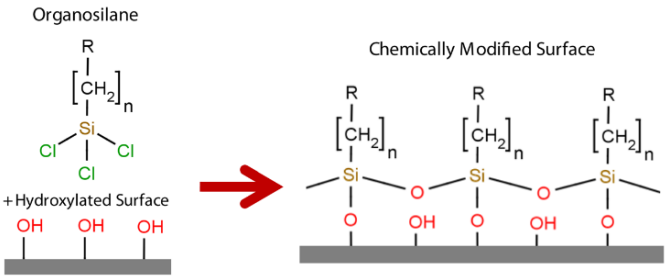


FIGURE 2.6 – Schéma de la réaction entre un organosilane et la surface du wafer activée, créant ainsi des liaisons covalentes Si-O-Si permanentes [100].

PDMS

Le matériau choisi pour réaliser les dispositifs microfluidiques est le PDMS (polydiméthylsiloxane). Ce polymère siliconé de formule $-[O-Si(CH_3)_2]_n-$ est largement utilisé en microfluidique. Il est en effet transparent, facile à utiliser, relativement peu cher et perméable aux gaz, ce qui en fait un choix particulièrement pertinent pour la microscopie et la culture cellulaire.

Le PDMS (Sylgard 184) est préparé de la façon suivante : il est mélangé avec son réticulant à un ratio 10 :1 (w/w). Il est ensuite dégazé sous une cloche à vide, puis coulé sur le wafer que l'on place pendant une nuit à 75°C (figure 2.7a). Cette étape permet la réticulation du polymère, qui peut ensuite être démoulé (figure 2.7b). On découpe alors les puces individuelles et on perce les trous qui serviront d'entrées et de sorties pour les écoulements à l'aide d'un poinçon de biopsie de 1,5 mm de diamètre (figure 2.7c).

Fabrication d'un moule en epoxy

Les wafers étant assez fragiles, on choisit également de réaliser des moules en résine epoxy beaucoup plus rigides et durables dans le temps. Pour cela, on démoule un premier réplicat en

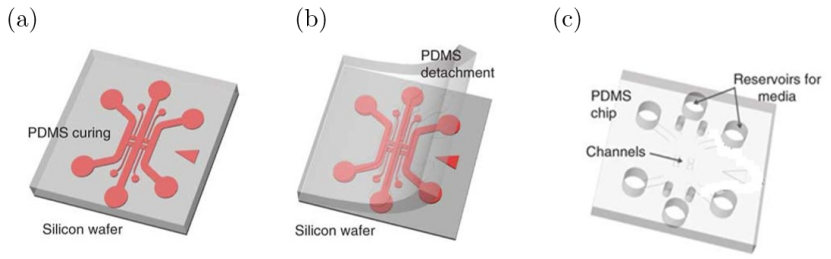


FIGURE 2.7 – Représentation schématique des étapes permettant d'obtenir la puce microfluidique en PDMS à partir du moule.

PDMS qui sert à son tour de moule (résine epoxy polyglass et son réticulant, Esprit Composite).

2.1.4 Scellement des puces

Substrat des puces

Les premières expériences ont été réalisées en collant les puces en PDMS sur un substrat en verre. Cependant, on a pu constater que dans certains cas, les hyphes parvenaient à décoller la puce du verre. De plus, le verre non traité est relativement peu adhésif, ce qui a pu mener parfois à l'observation d'un glissement en cours de croissance de *C. albicans*. On peut en voir un exemple sur la figure 2.8 où une levure subit un déplacement en arrière (vers la gauche sur la figure) sous l'effet de la croissance de l'hyphe contre la paroi.

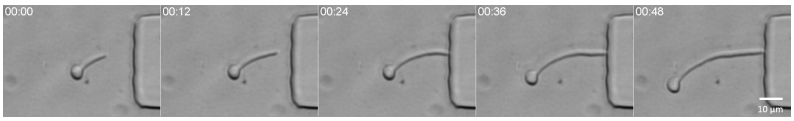


FIGURE 2.8 – Exemple de time-lapse où l'on voit une hyphe croître face à une paroi en PDMS. Sans aucune adhésion, l'hyphe peut alors glisser sur le verre.

Pour nous affranchir de ce phénomène, nous avons opté pour un substrat de verre recouvert d'une fine couche de PDMS, sur laquelle la puce en PDMS est ensuite collée. Ce choix présente deux avantages. Il nous permet tout d'abord de disposer d'une surface un peu plus adhésive. De plus, le collage de PDMS sur PDMS sera meilleur, évitant ainsi certains problèmes de décollement. Enfin, de cette façon, on obtient des canaux d'un matériau parfaitement homogène : les surfaces supérieures comme inférieures sont toutes en PDMS.

Pour cela, on réalise un fin coating de PDMS sur une lamelle de verre ronde à l'aide d'un *spin-coater*. Une épaisseur d'environ 30 µm a été choisie afin de ne pas augmenter la distance de travail nécessaire pour la microscopie. Après avoir effectué le spin-coating, les lamelles sont placées 2h à 75°C pour la réticulation du PDMS. Il est important de noter ici que pour nos expériences, les puces doivent se trouver dans un environnement relativement clos permettant à la fois de les protéger contre d'éventuelles poussières et autres contaminants et contre l'évaporation du milieu. Cela explique l'utilisation en général de boites de culture spécifiques. Mais pour avoir un coating homogène et de faible épaisseur de PDMS, il est nécessaire que le spin-coating soit

effectuée sur une lamelle et non directement dans une boite. Pour obtenir ensuite des boites, on utilise une méthode développée dans le laboratoire qui consiste à venir coller avec du PDMS la paroi d'une boite de Pétri classique, dont on aura préalablement retiré le fond, à notre substrat en PDMS. Pour plus de détails, se référer à [101].

Collage par plasma

Les 2 surfaces de PDMS (substrat et puce) sont oxydées à l'aide d'un plasma (Diener Pico), formant ainsi des groupes hydroxy Si-OH à la surface. En les mettant en contact, on crée alors des liaisons Si-O-Si, ce qui permet de coller la puce de manière covalente.

2.1.5 Caractérisation

Profilomètre

Les dimensions des structures fabriquées par photolithographie sur wafer sont mesurées à l'aide d'un profilomètre.

Le profilomètre optique à notre disposition accède aux informations de la surface grâce à l'interférométrie. Il s'agit de séparer le faisceau lumineux en deux parties : l'une est envoyée sur l'échantillon et ensuite réfléchie, tandis que l'autre servira de référence. La combinaison de ces 2 faisceaux produit alors des franges d'interférence lorsque l'objet est dans le plan focal. En effectuant un balayage vertical, il est ainsi possible de déterminer la topographie de la surface. L'avantage de cette technique est qu'elle s'effectue sans aucun contact avec les structures, et permet d'accéder à la topologie de champs de vue complets, et ainsi d'avoir une reconstruction 3D de la surface (figure 2.9). Cependant, cette méthode s'avère plus difficile lorsque l'on s'intéresse à de très petites épaisseurs (en dessous de 2 µm).

On choisit donc de mesurer ces valeurs avec un profilomètre mécanique. Le principe repose sur une pointe en diamant qui vient en contact avec la surface à caractériser, et dont la position verticale est mesurée. La pointe parcourt alors une ligne de longueur définie par l'utilisateur. On obtient ensuite le profil en z le long de cette ligne.

Exclusion de fluorescence

Il est cependant un peu plus difficile de mesurer la taille des canaux sur la puce en PDMS. Les dimensions sont à priori les mêmes que celles mesurées sur le wafer, mais on peut tout de même le vérifier en utilisant un liquide fluorescent. On peut alors utiliser la microscopie confocale pour déterminer les dimensions des canaux. L'utilisation d'un milieu contenant un polymère fluorescent comme le dextran permet également de réaliser de l'exclusion de fluorescence [102]. Cette technique sera mentionnée à plusieurs reprises dans ce manuscrit. Le principe est schématisé sur la figure 2.10 : à partir du maximum et minimum d'intensité de fluorescence et en connaissant la hauteur du canal, il est possible d'obtenir une calibration hauteur-intensité. Cela permet alors de connaître la hauteur d'un objet situé dans le canal à partir de l'intensité mesurée.

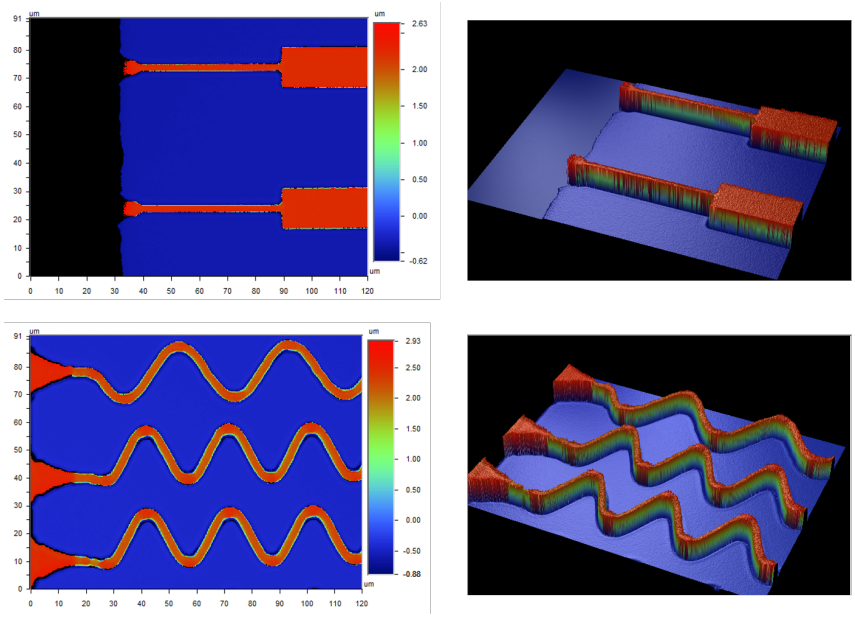


FIGURE 2.9 – Résultats obtenus par profilomètre optique sur des canaux d'environ 3 µm d'épaisseur.

2.2 Positionnement des levures

Dans tous les dispositifs microfluidiques que l'on va utiliser dans les chapitres suivants, on souhaite optimiser au maximum le nombre de canaux occupés par des hyphes. Pour y parvenir, on cherche à positionner les levures aux entrées des microcanaux. Les hyphes se développent toujours dans des directions aléatoires, mais étant proches des canaux, une grande partie d'entre eux vont s'y engager. Pour pallier ce problème de direction de croissance, la possibilité d'utiliser des chimioattractants de l'autre côté des canaux a été envisagée. Toutefois, étant donné qu'une partie de notre étude porte sur la croissance des hyphes et que le chimiotropisme des champignons est assez peu connu (et pourrait potentiellement affecter leur vitesse), nous nous sommes uniquement concentrés sur le piégeage des levures.

Notre objectif est donc de venir placer les levures à l'entrée des microcanaux, au lieu de les ensemencer librement partout dans le grand canal.

Un certain nombre d'études concernant l'optimisation du piégeage ont été réalisées. Elles s'intéressent à différents organismes biologiques : des cellules animales [103] [104], des hyphes [105], des plantes [93] [106] ou encore des grains de pollen [107] [108]. Ce dernier cas est assez similaire à notre situation puisqu'il s'agit de bloquer les grains de pollen pour ensuite étudier la croissance des tubes de pollen. Différents designs de puces, plus ou moins complexes, ont été proposés et quelques exemples sont représentés sur la figure 2.11. Des valves ont par exemple été utilisées pour bloquer des spores de champignons [105] (figure 2.11b), elles permettent un bon contrôle de leurs positions mais requièrent la mise en place d'un système assez complexe, avec de nombreuses entrées. La plupart des dispositifs reposent cependant sur un positionnement hydrodynamique où le flux va transporter les graines ou cellules jusqu'aux pièges prévus à cet effet, comme indiqué sur la figure 2.11a. Il s'agit alors de choisir au mieux les dimensions et

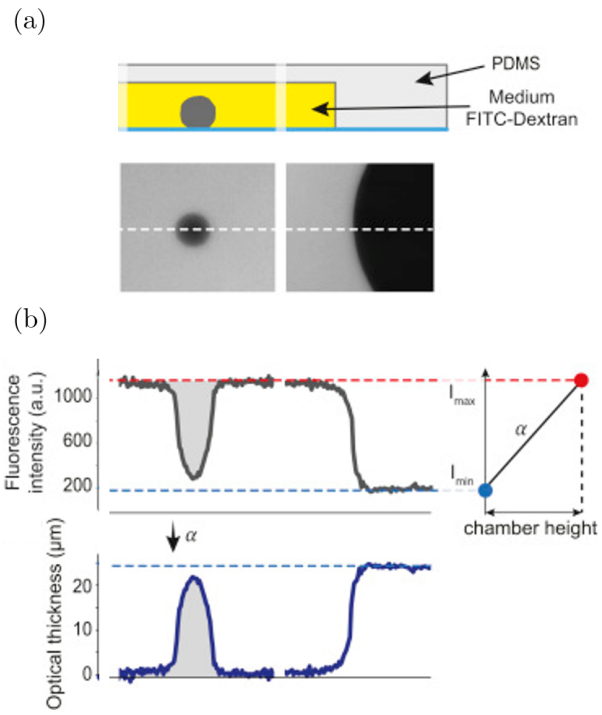
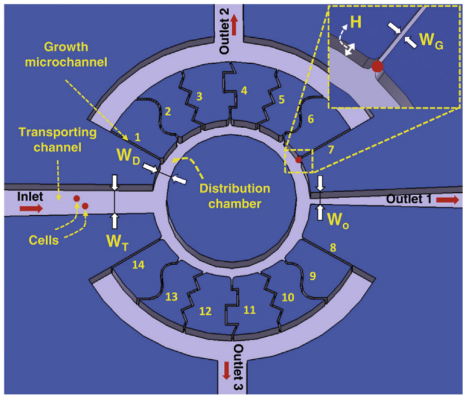
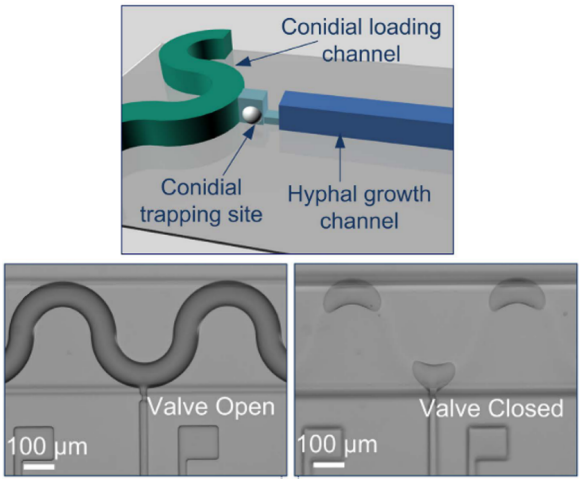


FIGURE 2.10 – Illustration du principe d'exclusion de fluorescence [102]. (a) Schéma et image de microscopie à fluorescence du canal dans lequel du dextran fluorescent a été introduit. (b) Profil d'intensité et à partir de la calibration, il est possible de trouver la hauteur des objets.

la forme des canaux. Des simulations numériques ont permis dans certaines études d'étudier l'écoulement, et ainsi de déterminer la géométrie optimale.



(a) Dispositif jouant sur le design et la géométrie pour diriger les grains de pollen à l'aide du flux hydrodynamique [108]



(b) Système de valves pour compartimentaliser et forcer la croissance dans les microcanaux [105].

FIGURE 2.11 – Dispositifs microfluidiques utilisés pour positionner et piéger des grains de pollen ou levures à l'entrée de microcanaux.

Nous avons fait le choix nous aussi de concevoir un système reposant sur un positionnement hydrodynamique. La section suivante est dédiée au calcul des résistances hydrauliques, qui nous

permettra ensuite de choisir les dimensions des canaux à adopter.

2.2.1 Résistance hydrodynamique

Le flux a tendance à suivre le chemin de moindre résistance. Il nous faut tout d'abord prendre en compte la résistance hydraulique des canaux.

Les écoulements en microfluidique sont laminaires et peuvent être représentés par analogie avec un réseau électrique. Le débit de l'écoulement Q (en unité de volume par unité de temps) peut ainsi être assimilé à un courant électrique i, tandis que la pression P en chaque point du système est équivalente à la tension électrique V. Cette analogie entre électricité et hydrodynamique en microfluidique est représentée sur la figure 2.12.

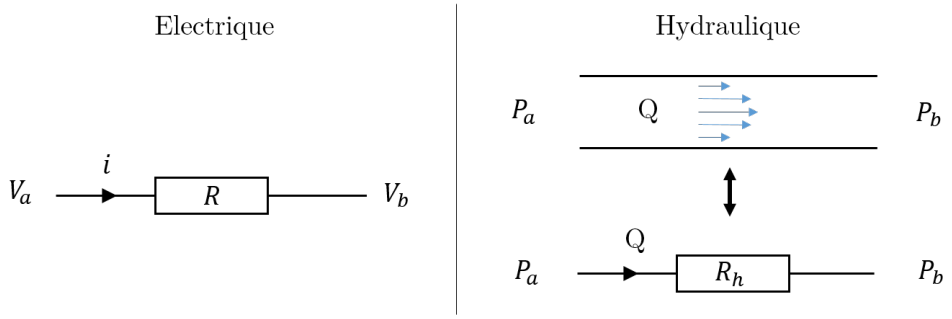


FIGURE 2.12 – Analogie entre résistance électrique et résistance hydraulique. La pression P est équivalente à la tension V et le débit Q au courant i.

Pour un circuit électrique, la loi d'Ohm nous donne la relation suivante :

$$\Delta V = Ri \tag{2.1}$$

en introduisant la résistance électrique R. On peut ainsi introduire par analogie une résistance hydraulique R_h :

$$\Delta P = R_h Q \tag{2.2}$$

On retrouve cette proportionnalité entre débit et différence de pression en partant de l'équation de Navier-Stokes, et plus particulièrement de l'équation de Stokes où les effets inertiels sont négligés car en microfluidique, on se situe à faible nombre de Reynolds.

$$\overrightarrow{grad}P = \eta \Delta \overrightarrow{v} \tag{2.3}$$

Il est ainsi possible à partir de la géométrie du canal, d'obtenir l'expression de la résistance hydraulique R_h. Les calculs ne seront pas développés ici, mais peuvent être trouvés dans ce livre [109].

Pour un écoulement de Poiseuille dans un canal de section circulaire, elle s'exprime sous cette forme :

$$R_h = \frac{8\eta L}{\pi R^4} \tag{2.4}$$

avec η la viscosité du fluide, L la longueur du canal et R son rayon. On voit ainsi que la résistance augmente avec la longueur du canal, et diminue avec son rayon : plus le canal sera long et étroit, plus la résistance sera grande. Pour un canal rectangulaire, ce qui est le cas la plupart du temps en microfluidique, il n'existe pas de solution analytique pour l'écoulement de Poiseuille. On peut cependant obtenir des résultats approximatifs en considérant une hauteur h nettement plus petite que la largeur w [109] :

$$R_h \simeq \frac{12\eta L}{[1 - 0.63(h/w)]h^3 w} \tag{2.5}$$

On peut donc utiliser cette équation pour estimer la résistance d'un microcanal. Les microcanaux sont en parallèle, par conséquent, de la même façon qu'avec un circuit électrique :

$$\frac{1}{R_{total}} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + ... + \frac{1}{R_n} = n\frac{1}{R_{microcanal}} \tag{2.6}$$

car ici tous les microcanaux sont similaires.

2.2.2 Optimisation du piégeage des levures

Pour que des levures viennent se placer au niveau des microcanaux, il est nécessaire que la résistance de ce chemin soit plus faible (ou au moins équivalente) que celle de l'autre chemin possible menant vers la sortie. On peut représenter de façon schématique la situation avec un circuit électrique (figure 2.13).

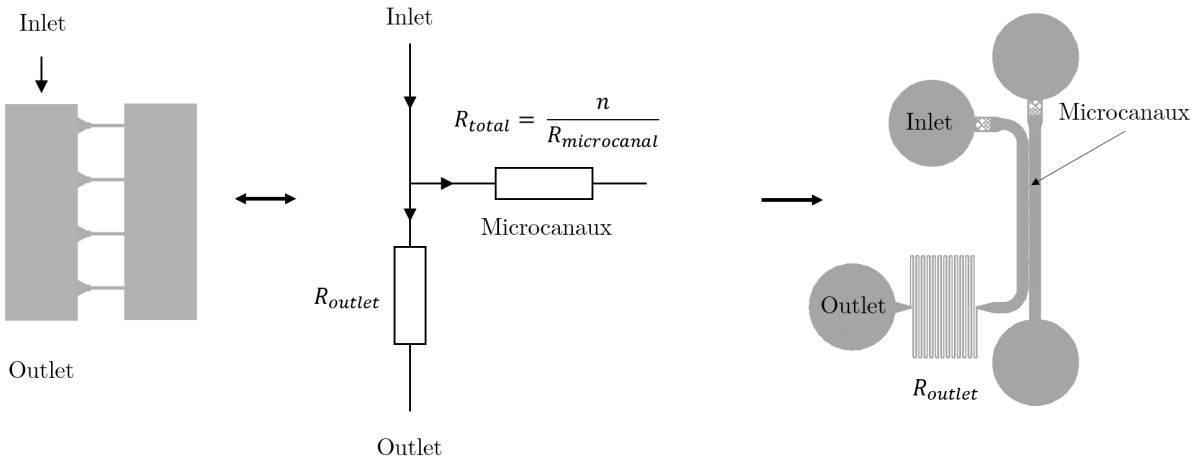


FIGURE 2.13 – Représentation schématique de la méthode utilisée pour piéger les levures. (a) Schéma d'une portion de la puce : les levures sont ensemencées à l'entrée et peuvent se diriger soit vers la sortie, soit vers les microcanaux. (b) Ces différents chemins sont représentés par analogie avec un circuit électrique en utilisant des résistances hydrauliques. Pour positionner les levures à l'entrée des microcanaux, il faut que $R_{microcanaux} \leq R_{outlet}$. (c) Design final d'une puce où un long serpentin sert à augmenter la résistance en sortie.

Etant donné que les dimensions des microcanaux et donc de $R_{microcanaux}$ sont fixées par les besoins des expériences, on propose alors d'augmenter la résistance en sortie R_{outlet}. Comme

on l'a vu précédemment, cela signifie augmenter la longueur du canal et/ou réduire sa section. La hauteur h de ce canal ne sera pas modifiée car cela impliquerait d'effectuer une étape supplémentaire de photolithographie avec alignement. Et il faut également prendre en compte le fait qu'il est préférable d'éviter des canaux à grand rapport d'aspect, donc avec une hauteur $h = 30\mu m$, on prendra $w = 20\mu m$. On va donc jouer finalement sur la longueur L jusqu'à obtenir une résistance équivalente à $R_{microcanaux}$: un long serpentin au bout du canal nous permet donc de remplir cette condition, comme indiqué figure 2.13.

L'utilisation de ce type de puce incluant un serpentin nous permet bien de diriger le flux vers les microcanaux et donc d'y positionner les levures. Lorsque qu'une levure se place à l'entrée d'un microcanal, sa résistance augmente encore et par conséquent le flux et les autres levures seront dirigées vers les autres microcanaux ou le cas échéant, vers la sortie.

2.3 *Candida albicans*

A présent, nous allons détailler les spécificités liées à notre objet d'étude : *C. albicans*.

2.3.1 Conditions de culture

Plusieurs milieux de culture peuvent être utilisés pour la croissance de *C. albicans*.

- un milieu complet YPD : yeast extract (1%), peptone (2%), glucose (2%)

- un milieu synthétique complet SC : YNB (yeast nitrogen base qui contient du sulfate d'ammonium en tant que source d'azote, des vitamines, oligo-éléments et sels) (0,67%), glucose (2%), acides aminés (0,2%).

Les souches de *C. albicans* sont stockées dans un mélange de YPD et de glycérol à -80°C. On peut également les étaler en stries sur une boîte de Pétri contenant un milieu solide. Celui-ci est composé de YPD auquel on ajoute de l'agar pour obtenir un gel. Ces boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 2 à 3 jours, le temps de voir apparaître des colonies. Elles sont généralement conservées à 4°C au maximum 3 semaines afin d'éviter l'apparition de mutations spontanées qui peuvent se produire chez *C. albicans*.

Avant chaque expérience, une préculture est réalisée. Cela consiste à transférer, à l'aide d'une anse, une colonie de la boite de Pétri, dans du milieu liquide YPD et à l'incuber à 30°C pendant la nuit sous agitation.

La densité de cellules obtenues après cette préculture peut être estimée par spectrophotométrie grâce à une mesure de turbidité. Des calibrations préalables ont en effet établi qu'une densité optique (DO) à 600 nm égale à 1 correspond à 10^7 cellules/ml. Cette relation est linéaire pour des valeurs d'absorption ne dépassant pas 0,9.

On peut ensuite diluer cette préculture dans le milieu de culture requis pour les expériences. L'induction de la filamentation peut s'effectuer de plusieurs manières, et comme on l'a expliqué en introduction, de nombreux facteurs interviennent dans cette transition morphologique [29]. On choisit ici d'induire la filamentation de façon particulièrement efficace en combinant plusieurs de ces conditions : la présence de N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) dans le milieu, ainsi qu'une

température de 37°C. Pour la plupart des expériences, et sans indication contraire, la préculture est diluée de façon à ce que quelques centaines de levures soient ensemencées dans une puce. Le milieu de culture généralement utilisé dans nos expériences est le GlcNAc à $1\,\mathrm{mg} \cdot \mathrm{mL}^{-1}$ dans le milieu SC.

2.3.2 Croissance dans un gel d'agar

Pour certaines expériences, nous avons observé la croissance d'hyphes au sein d'un gel d'agar. Il est constitué d'un réseau de deux polysaccharides rempli d'eau. Ainsi différentes concentrations d'agar donnent différentes rigidités de gel. Plusieurs études se sont intéressées aux propriétés mécaniques des gels d'agar, et ont mesuré la variation du module élastique de compression avec la concentration d'agar [110]. Il est possible d'obtenir une très large gamme de rigidité avec l'agar : une concentration de 0,2% donne un module de l'ordre de 1 kPa, tandis qu'avec 5%, il est possible d'atteindre jusqu'à 1 MPa.

L'agar est un gel thermo-réversible, c'est-à-dire que la formation de ce gel s'effectue grâce à des variations de température. En effet, l'agar est d'abord dissous dans de l'eau distillée à haute température et le gel se forme en refroidissant en dessous de la température de gélification qui se situe autour de 40°C. Il est ensuite possible de passer à nouveau à l'état liquide à haute température.

Nous pouvons donc réaliser des expériences avec des hyphes, nécessitant une température de 37°C pour leur croissance, tout en maintenant l'agar sous sa forme de gel.

En pratique, de grandes quantités d'agar sont préparées et conservées dans leur état de gel à température ambiante dans des contenants fermés pour éviter toute évaporation. Le gel est alors passé quelques secondes au micro-ondes afin de le liquéfier. La N-acétyl-D-glucosamine, qui est un inducteur de filamentation, est ajoutée à l'agar liquide à $1\,\mathrm{mg} \cdot \mathrm{mL}^{-1}$. Ensuite, les levures sont ajoutées à ce mélange, puis l'ensemble est déposé sur la surface de notre choix. Il est important lors de cette étape d'attendre d'avoir la température optimale pour le gel. En effet, s'il est trop chaud, les levures se sont ensuite plus viables. Mais le mélange devient impossible lorsque la température est trop basse car l'agar se solidifie rapidement, en particulier pour les fortes concentrations.

2.3.3 Souches utilisées

La souche SC5314 est considérée comme la souche de référence pour *C. albicans*. C'est un isolat clinique provenant d'un patient atteint d'une infection généralisée de *C. albicans* [111], qui a été utilisé dès 1968. Il a été montré que cette souche était virulente dans des modèles d'infection de souris [112]. Elle est donc souvent utilisée comme contrôle, et la plupart des souches de laboratoire transformées sont dérivées de SC5314. Elle est également prototrophe, cela signifie qu'elle est capable de proliférer dans un milieu de base sans nécessiter de facteurs de croissance spécifiques. Cette notion sera particulièrement importante lorsque l'on parlera par la suite des transformations génétiques.

On utilisera donc principalement cette souche sauvage de référence pour nos expériences.

Mais d'autres souches transformées en laboratoire seront également utilisées, afin d'avoir par exemple des marquages fluorescents de certains éléments du champignon ou de pouvoir conclure sur l'effet d'un gène sur un phénotype. Les tableaux suivants résument les caractéristiques de ces souches et leurs génotypes sont détaillés en annexe B.

Souche	Elément marqué	Provenance de la souche
Nop1-YPF/Cdc3-GFP	Noyau (Nop1) et septum (Cdc3)	Souche YJB8860 [113]
Tub2-GFP	Microtubules (Tub2)	Institut Pasteur (Sophie Bachellier-Bassi)
Nop1-CFP/Mlc1-YFP	Noyau (Nop1) et Spitzenkörper (Mlc1)	Souche YMG8255 [42]

Table 2.1 – Listes des souches fluorescentes utilisées.

Souche	Spécificité	Provenance de la souche
$\Delta\Delta pga59\Delta\Delta pga62$	Délétion des protéines ancrées à la paroi Pga59 et Pga62	Souche CEC377 [114]
$\Delta\Delta msb2$	Délétion de la mucine Msb2	Souche FCCa30 [115]
$\Delta\Delta als3$	Délétion de l'adhésine Als3	Souche CAYF178U [116]

Table 2.2 – Listes des autres souches utilisées.

2.3.4 Méthode de transformation

Une transformation génétique correspond à l'intégration d'un fragment d'ADN étranger dans une cellule. Des transformations peuvent se produire naturellement, ou être induites volontairement de façon à modifier le génome.

C'est donc un bon moyen d'obtenir des souches avec des marquages fluorescents pour certaines protéines dont on connait la fonction. On souhaite donc obtenir des marquages fluorescents pour le noyau, la membrane, le septum et le Spitzenkörper. L'objectif initial était d'avoir ces 4 marquages dans une même souche, grâce à 2 transformations successives. Le choix des gènes ciblés ainsi que la protéine fluorescente que l'on voulait lui associer sont indiqués sur le tableau ci-dessous. Une première transformation aurait donc marqué le noyau et le Spitzenköper avec la mCherry, et la seconde aurait fusionné la protéine fluorescente GFP aux gènes de la membrane et du septum.

Composant de la cellule	Gène ciblé	Fluorescence à intégrer
Noyau	Nop1	mCherry
Spitzenkörper	Bni1	mCherry
Membrane	Pma1	GFP
Septum	Gin4	GFP

L'objectif était de limiter au maximum les transformations, c'est-à-dire d'ajouter uniquement les protéines fluorescentes sans effectuer d'autres modifications du génome en ajoutant des gènes de sélection. Pour cela, nous souhaitions effectuer un tri des cellules transformées uniquement basé sur la fluorescence. La méthode de CRISPR-Cas9 nous permettait d'effectuer ces transformations simultanées tout en ayant un plus grand nombre de cellules transformées. On verra plus précisément par la suite ce qu'implique ce protocole, en décrivant les principales étapes du procédé de manipulations génétiques.

Étapes d'une transformation

En utilisant l'exemple concret de l'ajout de mCherry à Nop1, cette section a pour but de présenter les bases du fonctionnement d'une transformation génétique.

1. Identification du gène d'intérêt

   Dans un premier temps, il faut choisir les gènes que l'on veut cibler. On a décrit plus haut les éléments que l'on souhaitait marquer ainsi que les gènes et protéines fluorescentes associées. Par exemple, pour le noyau, nous avions choisi le gène codant pour la protéine Nop1 et le gène de fluorescence mCherry. Ce choix se base essentiellement sur les transformations qui ont déjà été réalisées (et donc réalisables), et sur les combinaisons de fluorescence que l'on souhaite.

2. Construction de l'ADN à insérer

   Il s'agit maintenant de fabriquer le fragment d'ADN souhaité. Etant donné que l'on souhaite cibler précisément l'emplacement du génome où l'on veut intégrer la séquence d'ADN, la technique choisie la plupart du temps est la recombinaison homologue. C'est un mécanisme présent au sein des cellules qui permet de réparer un ADN cassé en utilisant et copiant la séquence homologue de l'autre brin. L'objectif de la transformation est donc de réaliser une recombinaison homologue entre l'ADN génomique et l'ADN étranger. On va donc ajouter des séquences homologues, qui correspondent à celles trouvées dans le génome à la position qui nous intéresse, en plus du gène codant pour la protéine d'intérêt, comme indiqué figure 2.14. Selon la méthode de sélection choisie (se référer à l'étape 5), la séquence de nucléotides pourra également comporter un gène de résistance ou un marqueur d'auxotrophie.

   Prenons l'exemple de Nop1 surlequel on veut tagger la protéine mCherry. Il nous faut donc une séquence homologue correspondant à la fin du gène Nop1 (en bleu sur la figure 2.14), puis le gène codant pour mCherry (en rouge), puis une séquence homologue correspondant à l'ADN génomique juste après Nop1 (en gris).

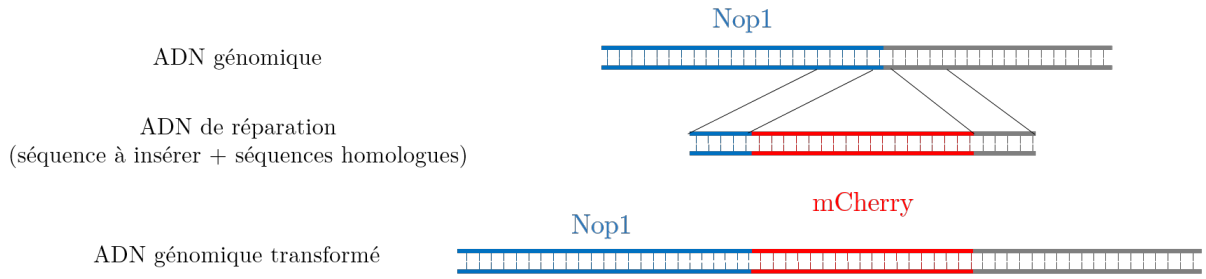


FIGURE 2.14 – Transformation génétique de l'ADN génomique par recombinaison homologue. Le cas de l'insertion du gène codant pour la protéine fluorescente mCherry à Nop1 est ici représenté. L'ADN de réparation à insérer dans la cellule est constitué du gène mCherry et des bras d'homologie correspondant à l'ADN génomique.

Cet ADN de réparation doit donc être construit en plusieurs étapes. En effet, on peut obtenir les séquences homologues à l'ADN génomique par PCR sur celui-ci. La PCR ou amplification en chaîne par polymérase est une technique permettant de dupliquer en grande quantité une séquence d'ADN. Le principe est illustré sur la figure 2.15 et repose sur l'utilisation d'amorces spécifiques de quelques dizaines de nucléotides qui vont venir s'hybrider sur l'ADN à répliquer. Les polymérases vont ensuite pouvoir synthétiser le brin complémentaire.

Il faut donc commencer par réaliser les amorces nécessaires aux PCR. Elles serviront aussi à délimiter le fragment d'ADN souhaité, et à faciliter ensuite la combinaison de ces différents fragments, à nouveau par PCR, pour obtenir finalement l'ADN de réparation, comme indiqué sur la figure 2.16.

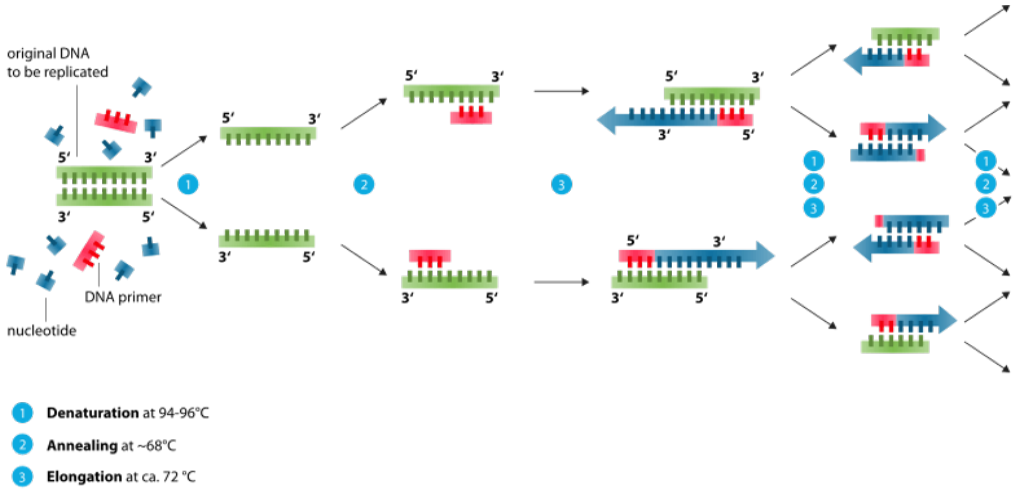


FIGURE 2.15 – Principe de l'amplification en chaîne par polymérase ou PCR. L'ADN est d'abord déshybridé, permettant de séparer les deux brins. Ensuite les amorces s'hybrident avec l'ADN et les polymérases synthétisent le brin complémentaire [117].

3. Insertion de l'ADN dans la cellule

   On parvient ensuite à faire rentrer les éléments nécessaires dans la cellule en la soumettant

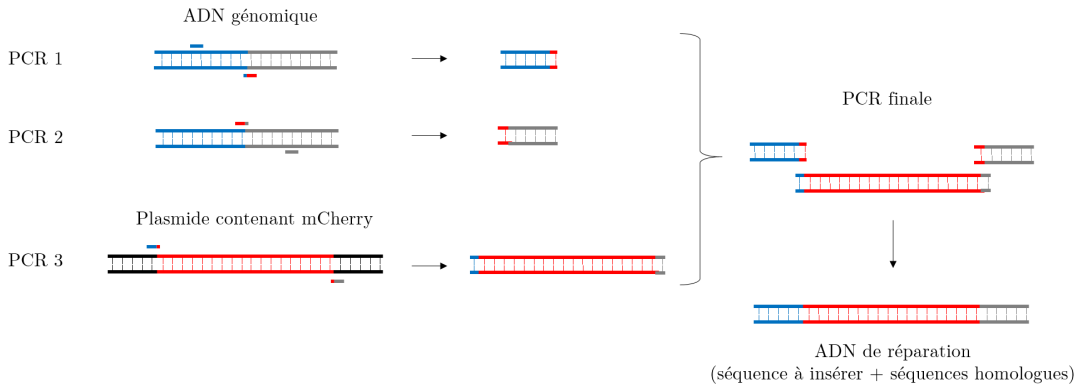


FIGURE 2.16 – PCR nécessaires à la réalisation de l'ADN de réparation contenant le gène codant pour mCherry et les bras d'homologie correspondant à l'ADN génomique. Les 3 fragments obtenus par PCR sur l'ADN génomique et le plasmide de laboratoire contenant mCherry sont ensuite combinés pour obtenir la séquence finale d'ADN à insérer.

à un stress. Il peut être thermique, électrique ou chimique et sert à augmenter la perméabilité de la membrane. Pour les levures, la méthode de transformation la plus largement utilisée repose tout d'abord sur la présence de PEG (polyéthylène glycol) pour lier l'ADN à la surface des levures. L'acétate de lithium et un choc thermique permettent d'augmenter la perméabilité de la paroi et donc l'efficacité de l'insertion de l'ADN dans les cellules [118].

4. Intégration de la séquence dans l'ADN génomique

   Une fois l'ADN à l'intérieur de la levure, il reste à l'intégrer au génome. Comme cela a été expliqué précédemment pour les besoins de la construction de la séquence de nucléotides, l'intégration se fait par recombinaison homologue.

5. Sélection des cellules transformées

   Cet élément est essentiel pour réaliser une transformation efficacement, car le nombre de cellules transformées est en réalité très faible par rapport à la quantité de cellules totales. On veut donc pouvoir discriminer rapidement les cellules qui ont intégré la séquence d'ADN étranger de celles qui n'ont pas été transformées. Pour cela, des marqueurs de sélection sont généralement introduits dans l'ADN génomique en même temps que le gène de fluorescence par exemple. Une première possibilité consiste à inclure un gène de résistance aux antibiotiques. Dans ce cas, en exposant les cellules à cet antibiotique, seules celles ayant été transformées (et donc contenant le gène d'intérêt et le gène de résistance) survivront.

   La seconde option est d'utiliser des marqueurs d'auxotrophie. A l'inverse du caractère prototrophe de la souche de référence SC5314, de nombreuses souches ont été rendues auxotrophes. Cela signifie qu'elles ne peuvent pas proliférer sans ajout d'un composé en particulier. Par exemple, pour *C. albicans* ou *S. cerevisiae*, le gène *URA3* code pour une enzyme qui sert à la synthèse d'un composant de l'ARN. Ainsi, une souche qui aurait subi la délétion de ses copies d'*URA3* serait auxotrophe pour l'uridine [119], et ne pourrait croître

sans sa présence dans le milieu de culture. Il est alors possible d'introduire à nouveau ce gène *URA3* (en même temps que le gène d'intérêt) dans ces souches auxotrophes pour effectuer la sélection : les cellules transformées sont alors prototrophes et proliféreront dans un milieu de base, contrairement aux autres. De nombreux autres outils ont été développés pour répondre aux challenges techniques des transformations génétiques [120] [121].

D'autres techniques ont été décrites dans le but notamment de contrôler l'expression d'un gène [122]. Un gène peut alors être exprimé ou non en fonction de la présence ou non d'un inducteur particulier. De la même façon, il est possible de sur-exprimer des gènes sous un promoteur spécifique.

6. Validation

   Enfin, il faut vérifier que cette modification génétique se soit correctement déroulée. Pour cela, on peut effectuer une PCR pour vérifier la présence du gène d'intérêt ou séquencer directement le génome.

CRISPR-Cas9

Nous allons maintenant discuter les particularités liées à CRISPR-Cas9, technique qui a été mise au point en 2012 et représentant une avancée majeure pour les manipulations génétiques. Cette technique a été inspirée du système immunitaire adaptatif de la bactérie *Streptococcus pyogenes*. Suite à l'invasion de virus par exemple, la bactérie mémorise la séquence d'ADN étranger et la copie au niveau des régions CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) dans son ADN. Lors d'une nouvelle infection, la bactérie peut alors transcrire cette séquence pour produire un ARN spécifique de l'ADN du virus et permettant sa reconnaissance. Cet ARN se lie ensuite à l'enzyme Cas9 (*CRIPSR associated protein 9*) et ce complexe se fixe sur l'ADN étranger. Cas9 coupe alors cet ADN, ce qui le rend inactif.

Ce système d'immunité a été adapté pour effectuer des transformations génétiques. Ces ciseaux moléculaires permettent en effet de cibler et couper très précisément l'ADN génomique de façon à ce que l'intégration par recombinaison homologue de la séquence d'intérêt se fasse beaucoup plus systématiquement.

La transformation de *C. albicans* à l'aide de CRIPSR-Cas9 a également été mise en oeuvre [123]. De plus, il a été montré qu'une expression transitoire de l'enzyme Cas9 est suffisante pour permettre une transformation effective [124]. Cela signifie qu'il ne serait pas nécessaire d'intégrer de façon permanente le gène codant pour Cas9 dans le génome, ce qui simplifie nettement la modification génétique.

Ce procédé requiert donc l'insertion dans la cellule de 2 éléments supplémentaires, comme indiqué sur la figure 2.17 :

- un fragment codant pour l'enzyme Cas9

- un ARN guide. Une portion de celui-ci est conçu de façon à s'hybrider à la portion d'ADN génomique ciblé, comme le montre la figure 2.17. L'autre partie de la séquence sert à recruter l'enzyme Cas9.

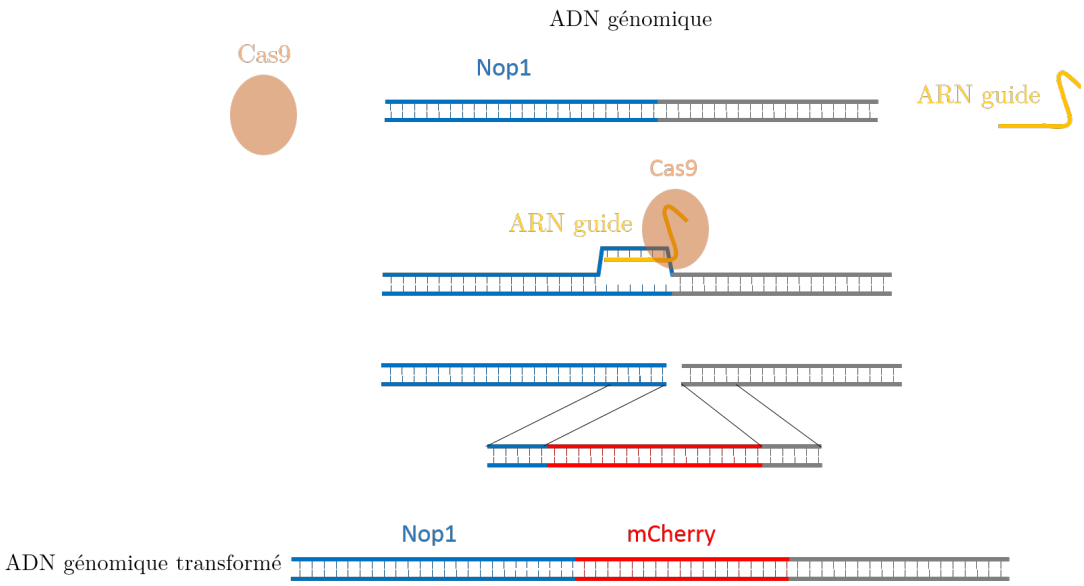


FIGURE 2.17 – Transformation génétique de l'ADN génomique à l'aide de CRISPR-Cas9 par recombinaison homologue. L'ARN guide permet de cibler précisément la position du clivage souhaitée et l'enzyme Cas9 coupe alors l'ADN. La recombinaison homologue avec l'ADN étranger introduit est alors d'autant plus favorable.

Bilan

Dans notre cas, nous avions initialement envisagé le tri par cytométrie de flux afin de sélectionner les cellules transformées. Cette méthode a l'avantage de modifier au minimum les séquences (en évitant l'ajout de gènes de résistance ou l'utilisation de souches auxotrophes) et donc rester le plus proche possible du background génétique de la souche de référence. Un FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) permet en effet de faire défiler un grand nombre de cellules tout en les caractérisant. Ici la propriété qui nous intéresse est la fluorescence : il est ainsi possible de trier les cellules selon qu'elles soient fluorescentes ou non.

Cependant, l'efficacité de transformation est en réalité très faible, même avec la méthode CRISPR/Cas9, ce qui rend la détection des cellules transformées très difficile. Nous avons alors envisagé de changer de protocole en utilisant cette fois un autre moyen de sélection. En parallèle, nous avons pu commencer à utiliser d'autres souches, décrites dans le tableau 2.1. Les résultats obtenus étant satisfaisants, nous avons choisi de continuer à les utiliser dans un souci d'efficacité.

2.4 Imagerie

2.4.1 Microscopie

Vidéo-microscopie

La plupart des séquences d'images ont été obtenues avec un microscope inversé (DMi8 Leica, équipé d'une caméra C11440, Hamamatsu), utilisant le logiciel Metamorph. La microscopie classique en champ clair est principalement utilisée, pour laquelle l'illumination se fait par trans-

mission de lumière blanche. Les études dynamiques sont réalisées grâce à une chambre dont la température est régulée à 37°C. On peut réaliser des acquisitions sur plusieurs positions, à intervalles de temps réguliers et si besoin, avec plusieurs longueurs d'onde.

L'intervalle entre chaque acquisition doit permettre à la fois un suivi temporel correct de la croissance des hyphes et l'acquisition d'un grand nombre de positions. Il est en effet possible de lancer une expérience avec jusqu'à 6 puces en même temps. Cet intervalle sera généralement compris entre 3 et 5 minutes.

Le choix de l'objectif va quant à lui conditionner la résolution des images ainsi que la taille du champ de vue. Un objectif 40x (HC PC Fluotar 0.8NA), sec pour effectuer une acquisition multi-positions, nous semble être un bon compromis. Des observations plus précises, en particulier des souches fluorescentes, seront également effectuées avec des plus forts grossissements (63x ou 100x).

Enfin, on souhaite également observer certaines souches fluorescentes décrites plus haut et certains marquages que l'on détaillera ensuite. La microscopie en fluorescence permet de détecter la lumière émise par un objet après avoir absorbé des photons. Prenons l'exemple de la protéine fluorescente verte GFP. Un laser à 488nm (proche du maximum d'excitation) est utilisé pour exciter la GFP. Le signal de fluorescence est ensuite récupéré avec un filtre d'émission (585nm) qui se situe autour du maximum d'émission, représenté sur la figure 2.18.

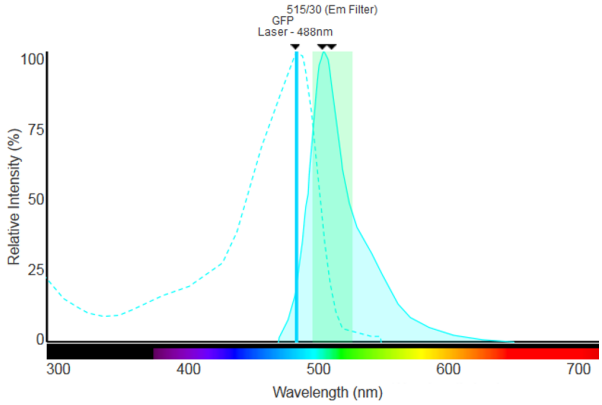


FIGURE 2.18 – Spectre d'absorption et d'émission de la GFP.

Microscopie confocale et spinning disk

Dans certains cas, on souhaite aussi visualiser la forme des hyphes en 3D, c'est-à-dire avoir une bonne résolution en z. La microscopie classique à champ large n'est alors pas adaptée car elle ne capte pas uniquement la lumière provenant du plan focal, mais également des plans adjacents, ce qui réduit fortement la résolution en z. Pour y parvenir, on utilise un microscope confocal (Leica TCS SP8 avec le logiciel LasX) qui va permettre de bloquer la lumière venant des plans adjacents à l'aide d'un sténopé (ou pinhole en anglais) [125]. L'utilisation d'un *spinning disk* permet de réduire le temps d'acquisition des images en plaçant plusieurs sténopés en parallèle.

2.4.2 Marquage au Calcofluor White

Le CalcoFluor White (CFW) est un fluorochrome qui se lie à la chitine présente dans la paroi cellulaire. Avec une excitation à 365 nm, le Calcofluor White a un maximum d'émission à 475nm et est donc observé avec un filtre DAPI (excitation à 350nm et émission à 460nm). On obtient un très bon marquage de la paroi, délimitant donc les contours des levures et hyphes, ainsi que la position des septums, comme on le voit sur la figure 2.19. Un marquage standard peut se faire à une concentration de $1\,\mathrm{mg} \cdot \mathrm{mL}^{-1}$. À noter que le Calcofluor White interfère avec les composants de la paroi et il faut donc éviter si possible de l'utiliser au cours de la croissance des hyphes, ou seulement à une concentration plus faible et sur des temps courts.

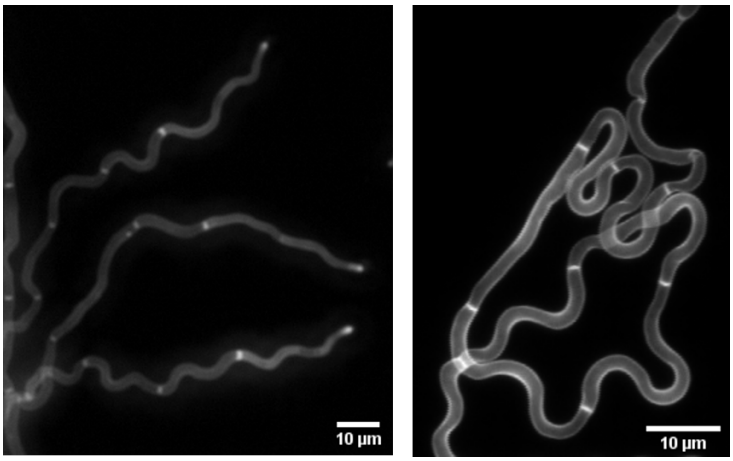


FIGURE 2.19 – Exemples d'images d'hyphes avec un marquage au Calcofluor White.

CHAPITRE 3

CARACTÉRISATION MÉCANIQUE DES HYPHES

Le vrai point d'honneur n'est pas d'être toujours dans le vrai. Il est d'oser, de proposer des idées neuves, et ensuite de les vérifier.

Pierre-Gilles de Gennes

3.1 Introduction

Les cellules sont non seulement capables d'exercer des forces mais aussi de ressentir les contraintes mécaniques extérieures. Ainsi, lorsqu'elles sont par exemple soumises *in vivo* à des forces de compression ou de cisaillement sous un flux, ces forces extérieures peuvent influer sur leur croissance, leur différenciation ou entraîner des changements de morphologie. De façon générale, il est important de quantifier à la fois les réponses cellulaires aux contraintes environnementales et les forces mises en jeu dans ces réponses, ainsi que les propriétés élastiques (ou visco-élastiques) des cellules.

Notons également que pour les cellules animales, les éléments essentiels qui structurent les cellules sont le cytosquelette et la membrane plasmique, alors que pour les champignons ou les plantes, comme cela a été expliqué dans le chapitre 1, ce sont la paroi cellulaire et la pression de turgescence qui contribuent principalement à la mécanique des cellules. Caractériser les propriétés et les réponses mécaniques des hyphes dans leur ensemble s'avère d'autant plus important que ces organismes parviennent à envahir des tissus épithéliaux en partie grâce à leur rigidité et aux forces qu'ils développent.

Le principe général pour mesurer des caractéristiques mécaniques est d'appliquer une force ou une déformation à un objet et de quantifier sa réponse. C'est ce qui est fait à l'échelle macroscopique avec par exemple des tests de tension, de compression ou de déflexion. Les mêmes concepts sont utilisés à échelle micrométrique, mais le développement de ces outils représente un défi technique qui donne lieu à différentes approches selon l'objet et la problématique en

question.

Nous nous intéresserons dans cette introduction aux méthodes expérimentales mises en place dans la littérature pour quantifier des paramètres physiques comme la rigidité cellulaire ou la force développée. Cette revue sera non seulement focalisée sur les champignons, mais aussi les tubes de pollen qui ont un mode de croissance similaire à celui des hyphes. Les technologies mises en oeuvre pour les tubes de pollen pourraient donc potentiellement être appliquées aux hyphes.

3.1.1 Mesures de propriétés mécaniques

Nous allons commencer par présenter quelques outils qui ont été développés avant l'utilisation de la microfluidique pour mesurer des propriétés mécaniques.

Pinces optiques

Le principe de fonctionnement des pinces optiques est représenté en figure 3.1a. Elles utilisent le gradient de champ électrique autour du point de focalisation d'un faisceau laser pour déplacer des particules diélectriques vers le centre du faisceau. La force générée maintient donc la particule au centre du faisceau, ce qui permet de la piéger ou de la déplacer. Cette technique non invasive a été largement utilisée en biologie pour la manipulation de l'ADN ou d'organelles à l'intérieur de cellules, et plus largement pour étudier la déformation de cellules entières. La déformation de globules rouges a par exemple été étudiée en fixant des billes à la cellule, puis en déplaçant ces billes grâce à une pince optique, ce qui résulte en un étirement de la cellule, comme on le voit sur la figure 3.1b [126].

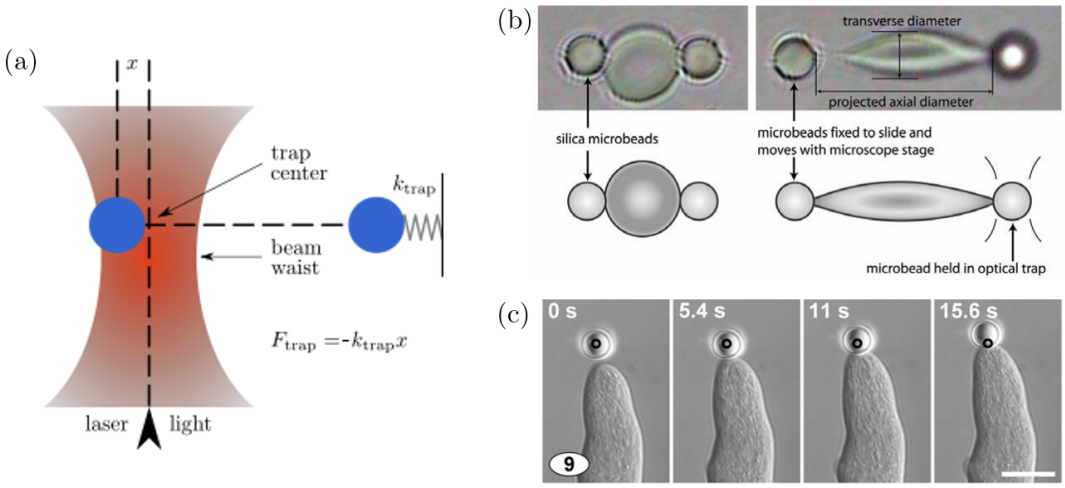
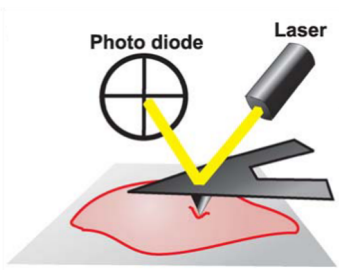


FIGURE 3.1 – Utilisation des pinces optiques pour la caractérisation des propriétés mécaniques des cellules. (a) Principe de la méthode : les objets sont attirés au centre du faisceau, et subissent une force de rappel qui les ramène systématique au centre et ainsi les piège [1]. (b) Déformation d'un globule rouge à l'aide d'une bille attachée à la cellule et déplacée à l'aide d'une pince optique [126]. (c) Une pince optique ne parvient pas à exercer une force suffisamment grande pour résister à la croissance d'une hyphe [39].

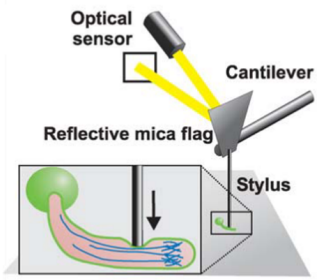
Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de contact direct et d'être très précise. Cependant les forces générées sont assez faibles (de l'ordre de quelques centaines de pN au maximum). C'est pourquoi elle est très utilisée pour les cellules animales, mais elle n'est pas vraiment applicable aux organismes qui nous intéressent car ces forces ne suffisent pas à déformer des cellules ayant une paroi rigide. Une étude a néanmoins montré que les pinces optiques pouvaient être utilisées pour déplacer des levures, ou manipuler des organelles à l'intérieur des cellules (le déplacement du Spitzenkörper résultant en un changement de direction de croissance par exemple) [39]. Cependant, les auteurs ont confirmé que la force générée par la croissance des hyphes était trop grande pour être mesurée à l'aide de cette technique. On voit sur la figure 3.1c qu'une hyphe parvient à pousser la bille en dehors du piège optique. Cela confirme que les forces exercées par les hyphes sont largement supérieures aux pN développés par les cellules animales.

Indentation - Microscopie à forme atomique (AFM)

L'indentation consiste à mesurer la force nécessaire à la déformation locale d'une cellule pour déterminer ensuite sa rigidité. Le microscope à force atomique ou AFM est souvent utilisé car il permet d'obtenir à la fois la topographie de la surface d'étude et des informations sur la rigidité locale. Le dispositif, schématisé en figure 3.2a, consiste en une très fine pointe située à l'extrémité d'un levier et qui entre en contact avec la surface. La déflexion de ce levier et par conséquent les déformations de surface sont détectées par la déflexion d'un faisceau laser. Il est alors possible d'indenter localement l'échantillon pour mesurer la force résultant de cette interaction et ainsi en déduire des propriétés mécaniques de la cellule.



(a) Microscopie à force atomique (AFM)



(b) Micro-indentation

FIGURE 3.2 – Schémas du principe de fonctionnement de méthodes d'indentation [127].

Cet outil a été utilisé sur une large variété d'organismes biologiques comme des cellules animales, des plantes [128] et également des champignons [129] [130] [131]. Cette méthode fournit une mesure locale de la rigidité. Il a par exemple été montré que la rigidité apparente mesurée était plus faible à l'apex des tubes de pollen que dans les régions sub-apicales [132]. Mais l'angle d'approche entre la pointe de l'AFM et la paroi varie également le long du tube de pollen et peut induire une erreur. Il est en effet important de noter que ces mesures dépendent de nombreux paramètres, à la fois de la géométrie de l'indenteur et de l'angle de contact avec l'échantillon

1. Schéma extrait de https://en.wikipedia.org/wiki/Optical_tweezers

mais aussi de paramètres propres à la cellule comme l'épaisseur de paroi.

Plusieurs études se sont intéressées à la mesure des propriétés mécaniques des levures par AFM. Le module de Young est déduit à partir des courbes de force-indentation et des valeurs moyennes allant de 0,2 à 1,5 MPa sont obtenues pour les levures de *C. albicans* [129] [130]. Les auteurs ont montré à l'aide de mutants spécifiques que leurs propriétés mécaniques dépendent largement de la réticulation des composants de la paroi, et pas uniquement de la composition de cette paroi [133]. L'utilisation d'antifongiques comme la caspofungine a également un impact important sur la paroi et semble augmenter notablement la rigidité des levures (de 0,2 MPa sans traitement à 1,3 MPa avec une grande concentration de caspofungine) [129].

L'AFM a plus rarement été utilisé pour mesurer les propriétés d'hyphes. Dans le cas de *A. nidulans*, un module élastique de l'ordre de 100 MPa a été trouvé et il est également dépendant de la structure de la paroi [131]. L'observation de ces hyphes avec l'AFM a également permis de montrer qu'il existe des différences de structures entre l'apex de l'hyphe en croissance et les régions matures, qui sont effectivement corrélées à des différences de rigidité [134]. En effet, les zones à l'apex en cours d'extension sont moins rigides que les zones matures des hyphes, ce qui suggère une rigidification de la paroi après son dépôt à l'apex.

Le même principe a été utilisé pour des expériences de micro-indentation qui ont notamment été menées sur des tubes de pollen [135]. Le principe est schématisé sur la figure 3.2. Ce dispositif avec un indenteur assez long permet d'observer en même temps la cellule et donc de suivre visuellement sa déformation.

Autres techniques

D'autres techniques qui ne seront pas explicitées ici font l'objet de revues détaillées [136] [127]. Des jauges de déformation ont par exemple été utilisées pour déterminer directement la force exercée par des hyphes ou des tubes de pollen. Il a cependant été suggéré que ces mesures pourraient sous-estimer les valeurs réelles de forces exercées [137]. Une étude menée sur différentes espèces montre que les forces mesurées pour ces différents types d'hyphes varient largement [138]. Mais de façon générale, les filaments larges exercent des forces plus importantes que les filaments plus fins. La comparaison de la pression exercée (force divisée par la surface de contact) suggère que cette pression générée est du même ordre de grandeur pour une grande variété d'espèces (autour de 0.06 MPa). A noter toutefois que l'estimation de la surface de contact est une source d'erreur car elle est difficilement mesurable visuellement. Dans plusieurs études, elle a été estimée égale à $2\pi r^2$, correspondant à l'aire d'une demi-sphère, avec r le rayon de l'hyphe en amont de l'apex [139]. Cependant, on peut s'interroger sur la pertinence de cette estimation, qui suppose que l'apex de l'hyphe s'aplatit au contact de la surface jusqu'à atteindre une aire de contact deux fois plus grande que la surface en coupe de l'hyphe. On constate notamment des différences de comportement selon les hyphes, qui s'aplatissent plus ou moins contre la surface, ayant donc des surfaces de contact variables.

Des guides d'ondes optiques ont également été développés pour mesurer la force exercée lors de la formation d'un appressorium, qui s'élève à environ 17 µN [140]. Cependant, cette technique

nécessite une forte adhésion de l'appressorium à la surface et ne peut donc pas nécessairement être utilisée pour d'autres applications.

D'autres méthodes de caractérisation des propriétés mécaniques des hyphes ont aussi été utilisées, notamment pour déterminer la pression de turgescence interne. Des sondes permettent alors de modifier la pression, et de mesurer les changements de volume [141]. Plus récemment, la technique d'aspiration par micropipette a été adapté de façon à étudier l'effet d'une pression externe locale (contrairement aux expériences de sonde de pression) sur des hyphes de faibles diamètres (*A. nidulans* d'environ 3 µm de diamètre) [142]. Cela a permis de montrer la corrélation entre la pression à l'apex de l'hyphe et la vitesse de croissance.

3.1.2 Mesures de propriétés mécaniques avec la microfluidique

L'émergence de la microfluidique a permis le développement de nouvelles méthodes de caractérisation mécanique de cellules ayant une croissance apicale. Comme nous l'avons décrit au chapitre 1, la microfluidique présente de nombreux avantages dont le contrôle complet des conditions environnementales et l'observation en direct de la réponse des cellules à des stimuli. Cette partie sera l'occasion de présenter quelques méthodes de microfluidique développées récemment. On distinguera les techniques qui impliquent la déformation de l'environnement par l'action des cellules et donnent accès à la force développée, de celles qui utilisent une contrainte extérieure pour étudier la déformation des cellules et ainsi mesurer leur rigidité.

Mesure de forces : déformation du milieu extérieur par les cellules

Le principe général est ici de quantifier la déformation d'un matériau sous l'effet des forces exercées par les cellules. Il s'agit ensuite d'utiliser des courbes de calibration ou des modèles numériques ou théoriques afin d'en déduire la force générée. Plusieurs exemples sont présentés ici et illustrés sur la figure 3.3.

La façon la plus simple de procéder est de mesurer la force développée à la pointe d'un filament par simple indentation d'un polymère, typiquement le PDMS. Pour cela, il est nécessaire de réaliser au préalable une courbe de calibration force-indentation de ce polymère à l'aide d'un AFM. Un exemple de déformation du PDMS induite par le contact d'une hyphe est représenté en figure 3.3a. Sa mesure permet de déduire la force développée, qui est d'environ 8,7 µN pour les hyphes de *C. albicans* dont le diamètre est de 2 µm et la vitesse de croissance de l'ordre de $0.3\ \mu m \cdot min^{-1}$ [64].

Une méthode souvent utilisée pour les cellules animales consiste à utiliser la déflexion de piliers sous l'effet des forces exercées. Une puce microfluidique a été développée pour adapter cette technique à la croissance des hyphes d'*Achlya bisexualis* [143]. Ces piliers cylindriques, fixés au sol de la puce, mais libres de l'autre côté, sont donc défléchis sous l'action d'une hyphe. Cette déflexion peut être suivie visuellement, comme on le voit sur la figure 3.3b, et un modèle de déflexion prenant en compte les propriétés du pilier permet ensuite de la convertir en une valeur de force (dont l'amplitude et la direction sont également représentées). Cette étude a notamment permis de corréler un ralentissement de la croissance de l'hyphe au moment du

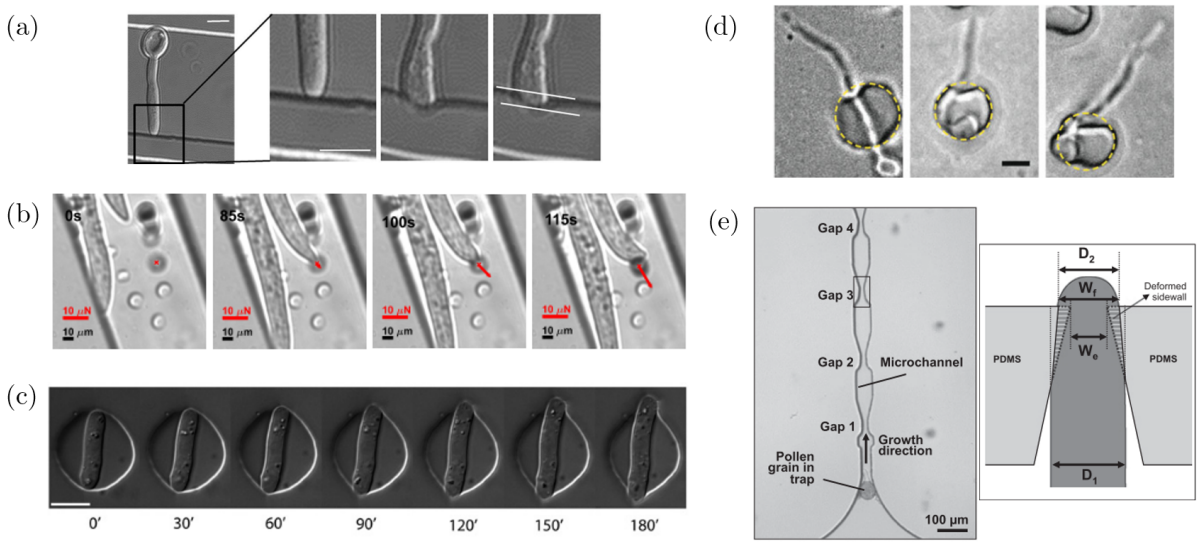


FIGURE 3.3 – Plusieurs dispositifs microfluidiques dédiés à la mesure des forces exercées par des hyphes ou tubes de pollen et utilisant la déformation de PDMS ou la déflexion de piliers. (a) Déformation du PDMS due à la force appliquée par l'apex d'une hyphe de *C. albicans* [64]. (b) Déflexion d'un pilier en PDMS sous l'effet d'une hyphe de *A. bisexualis* : la position du pilier est suivie au cours du temps, et la direction et l'amplitude de la force déduite sont indiquées par le vecteur rouge [143]. (c) Levure *S. pombe* se développant et déformant une chambre de PDMS de faible rigidité [144]. (d) Pénétration des hyphes de *C. albicans* dans du PDMS de rigidité variable [145]. (e) Schéma du principe de déformation de parois de PDMS au niveau de constrictions par un tube de pollen [146].

contact avec le pilier à une augmentation de la force exercée. Les forces générées par ces hyphes avoisinent 10 µN, de façon similaire à celles développées par *C. albicans*, tandis que leur diamètre est d'environ 20 µm et leur vitesse de croissance est égale à $6\,\mu m \cdot min^{-1}$.

Des parois de PDMS ont aussi été utilisées en tant que capteurs de force pour la levure à fission *S. pombe* [144]. Les levures sont placées dans des puits de PDMS et la façon dont elles se développent dépend de la rigidité du PDMS qui peut être facilement modulée en changeant le ratio de réticulant vs polymère. Une grande rigidité induit une courbure des levures, tandis que la levure est capable de déformer un matériau moins rigide, comme le montre la figure 3.3c. La croissance de la levure contre les parois de PDMS entraîne une augmentation de la force exercée et également une réduction de la vitesse de croissance. La force maximale que la levure peut exercer correspond alors à la force externe nécessaire pour stopper sa croissance. A noter que cette force n'a pas pu être mesurée expérimentalement car la levure se courbe plutôt que d'arrêter complètement sa croissance. Toutefois, en extrapolant la courbe force-vitesse de croissance obtenue, cette force est estimée à 11 µN pour un diamètre de la levure d'environ 4 µm.

Des puits de PDMS ont également été utilisés afin d'étudier le comportement invasif des hyphes de *C. albicans* [145], comme on le voit sur la figure 3.3d. Une valeur maximale de rigidité de PDMS d'environ 200 kPa a été établie, au-delà de laquelle les hyphes ne parviennent plus à le pénétrer, ce qui correspond à une force maximale exercée de 35 µN.

L'utilisation de microcanaux comportant des constrictions a également été explorée afin de tester les capacités d'invasion de tubes de pollen (figure 3.3e) [146]. Cette puce permet donc dans un premier temps de se rapprocher de la situation *in vivo* où le tube de pollen doit progresser dans un environnement avec des contraintes physiques. La déformation des parois de PDMS par le tube de pollen invasif mène à la détermination de la force exercée. Au niveau de ces constrictions, dont la largeur est inférieure au diamètre des filaments, deux choix sont possibles : le tube de pollen doit déformer les parois ou il doit réduire son diamètre. La première situation a été modélisée à l'aide de simulations numériques utilisant la méthode des éléments finis afin de déduire la force générée par les tubes de pollen contre les parois de PDMS. Le modèle prédit une force d'environ 15 µN pour un filament de diamètre égal à 17 µm, qui croît à une vitesse de l'ordre de $5\,\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$.

Nous avons donné ici quelques valeurs de forces développées par des cellules à croissance apicale qui sont toutes de l'ordre de la dizaine de µN. Les pressions associées peuvent également être obtenues en connaissant la surface de contact. Il est important de souligner ici la différence entre des mesures de pression exercée à l'apex des hyphes et celles de pression de turgescence. Cette dernière est une pression interne qui exerce donc une force sur la surface interne de la paroi. Si la paroi est infiniment rigide, cette pression n'est pas ressentie à l'extérieur, il n'y a pas de force externe. Mais si la paroi s'assouplit à l'apex, une partie de cette pression de turgescence est transmise à l'extérieur, ce qui génère une force à l'apex. Il est suggéré que pour les hyphes, seulement 10 à 30% de la pression de turgescence contribue aux forces protrusives [147] [143]. Au contraire, les tubes de pollen auraient une paroi à l'apex plus souple puisque ces deux valeurs de pression sont plus proches [146].

Mesure de rigidité : déformation des cellules sous l'effet d'une contrainte externe

Une autre approche consiste à exercer une contrainte extérieure sur les cellules et à étudier leur réponse pour en déduire leurs propriétés mécaniques. On s'intéresse ici essentiellement aux caractéristiques mécaniques de la paroi, qui confère leur rigidité aux cellules. Plusieurs exemples décrits ici sont illustrés en figure 3.4.

Il est par exemple possible de soumettre les cellules à une compression pour obtenir des courbes de force-déformation. Un modèle permet ensuite d'estimer le module de Young des cellules comprimées. Cette méthode a l'avantage de produire une force distribuée sur une large zone, permettant de détecter les propriétés moyennes de la paroi, plutôt qu'une mesure très locale effectuée par micro ou nano-indentation. Ce procédé a été utilisé pour compresser des cellules de plantes à l'aide d'une sonde [148], mais également la levure *S. cerevisiae* pour laquelle un module élastique de 110 MPa a été déterminé [149]. Plus récemment, un système plus complexe a été optimisé et adapté à l'étude de cellules à croissance apicale, notamment des tubes de pollen [150]. Pour cela, des valves sont utilisées d'une part pour piéger et orienter les grains de pollen, et d'autre part pour exercer une pression uniforme sur le filament par l'intermédiaire d'une membrane de PDMS, comme indiqué sur la figure 3.4a. Les auteurs ont montré à l'aide d'un modèle à éléments finis que les tubes de pollen étudiés ont un module de Young moyen de

85 MPa.

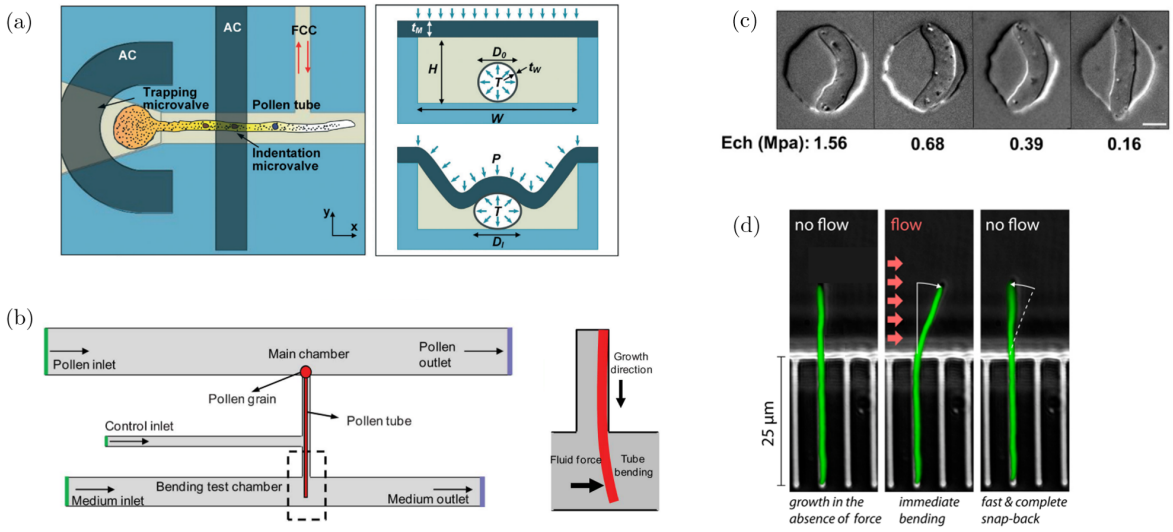


FIGURE 3.4 – Plusieurs dispositifs microfluidiques dédiés à la mesure de la rigidité de la paroi d'hyphes ou de tubes de pollen en exerçant des contraintes extérieures aux cellules. (a) Schéma du principe utilisé pour appliquer une force de compression à l'aide de valves au sein d'une puce microfluidique [150]. (b) Schéma de la puce utilisée pour guider l'élongation d'un tube de pollen, maintenir sa position et le défléchir sous l'effet des forces hydrodynamiques d'un écoulement [151]. (c) Comportement de *S. pombe* dans des chambres de PDMS à rigidité variable : on observe le flambage de la levure ou la déformation des parois selon la rigidité du PDMS [144]. (d) Déflexion sous flux de filaments de *E. coli* : on voit ici une déformation élastique car le filament revient à sa position initiale lorsque le flux est arrêté [152].

L'étude citée précédemment sur *S. pombe* a également mesuré le module de Young de la paroi de ces levures [144]. Pour cela, un équilibre entre la force seuil nécessaire au flambage de la levure et la force associée à la déformation de la chambre de PDMS est établi. Cette équation permet alors d'estimer ce module élastique en connaissant l'épaisseur de la paroi. Ici une épaisseur de 200 nm a été utilisée et les auteurs ont ainsi obtenu un module de Young pour la paroi de la levure de 100 MPa.

Enfin, plusieurs travaux utilisent des forces hydrodynamiques dans une puce microfluidique pour étudier les propriétés mécaniques de bactéries et tubes de pollen [153] [152] [151]. C'est ce principe que nous utiliserons et adapterons dans ce chapitre à l'étude des hyphes de *C. albicans*. Il s'agit d'utiliser un flux pour exercer une force sur un filament fixé d'un côté et libre de l'autre, comme représenté sur les figures 3.4b et d. La déflexion du filament induite par cette force permet le calcul du module de flexion à partir de la théorie élastique classique des poutres. En connaissant les caractéristiques géométriques du filament, il est ensuite possible d'en déduire le module de Young de la paroi. L'estimation pour les tubes de pollen se situe autour de 350 MPa, tandis qu'elle est de 30 MPa pour les bactéries. Avec ce système, les auteurs ont aussi pu étudier les déformations élastiques ou plastiques des filaments de *E. coli* en appliquant des forces variables en contrôlant le débit du flux appliqué, avec des pulses rapides, des flux continus ou des cycles successifs de stress et relaxation [153] [152].

3.1.3 Discussion

On constate ici de très grandes différences d'ordre de grandeur obtenu pour la rigidité des champignons. En effet, pour la même levure *S. cerevisiae*, un module de Young d'environ 1 MPa est déduit de mesures par AFM, tandis qu'il est deux ordres de grandeur supérieur lorsque déduit d'une méthode de compression. Les grandes disparités de valeurs reportées de propriétés mécaniques ont été discutées en particulier pour les cellules animales [154]. De nombreux facteurs peuvent entrer en jeu, on peut observer par exemple des variations de mesures à différents endroits d'une même cellule ou des variations au sein d'une population. Certains paramètres influencent également la mesure comme la vitesse d'indentation pour l'AFM, la taille et forme de l'indenteur, la température etc...

Un facteur supplémentaire est à considérer dans le cas des cellules ayant une paroi rigide. En effet, nous avons vu que l'équilibre entre la pression de turgescence interne et la paroi cellulaire était indispensable à la croissance et au maintien de ces cellules. De ce fait, mesurer les caractéristiques de la paroi uniquement s'avère plus complexe car il est nécessaire de séparer la contribution de la pression de turgescence de celle de la paroi. Plusieurs études suggèrent ainsi que l'extraction classique d'un module élastique à partir de mesures d'AFM notamment ne suffit pas à fournir une véritable valeur. Des modèles théoriques d'indentation de cellules sous pression ont ainsi été établis [155]. Pour reprendre l'exemple de *S. cerevisiae*, ce modèle prédit un module de Young compris entre 10 et 50 MPa à partir d'expériences d'AFM.

Il semble au contraire qu'il n'est pas nécessaire de prendre en compte la pression de turgescence pour les expériences de flambage dans les puits ou celles de flexion sous flux, car elle est compensé par la tension de la paroi. Des simulations ont d'ailleurs montré pour les tubes de pollen que l'ajout d'une pression interne de 0,4 MPa (valeur standard de pression de turgescence) n'avait pas d'influence sur la valeur de module élastique trouvée pour des expériences de flexion [151]. Ce type de méthode semble donc plus approprié pour caractériser les propriétés mécaniques de la paroi de ces cellules à paroi rigide. Pour notre étude, la méthode consistant à appliquer un flux afin de défléchir les filaments a été préférée. Elle semble particulièrement adaptée à une morphologie allongée de filaments et nécessite une moins grande précision que la technique qui consiste à mesurer la variation de diamètre sous compression (qui est utilisé pour des tubes de pollen de diamètre largement supérieur à celui des hyphes de *C. albicans*).

3.2 Principe de la mesure de rigidité

Nous allons à présent détailler les différents éléments nous permettant de mesurer la rigidité des hyphes de *C. albicans*. Le schéma de la figure 3.5 représente la situation générale : les hyphes croissent d'abord dans des microcanaux (selon la direction y) qui les maintiennent fixées, puis dans un large canal où un flux peut être appliqué (selon la direction x). Ces filaments se situent ainsi au niveau du sol de la puce.

Afin d'adapter ce système aux hyphes, nous avons développé une nouvelle puce microfluidique, dont les caractéristiques seront discutées dans la suite de ce chapitre. De plus, le modèle

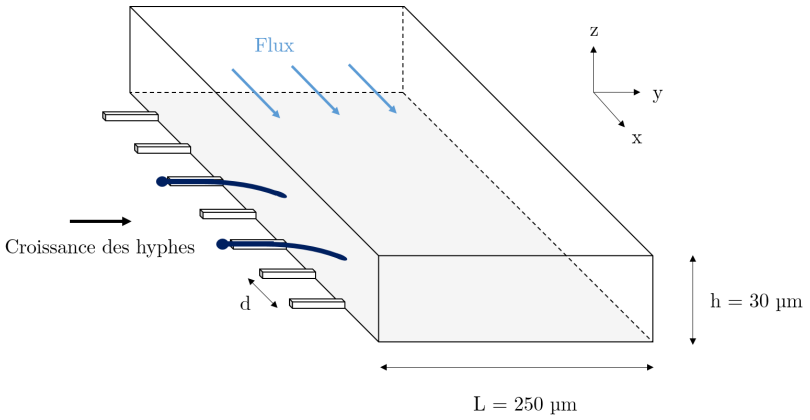


FIGURE 3.5 – Représentation schématique du principe de l'expérience. Des levures sont positionnées à l'entrée de microcanaux et la croissance d'hyphes est induite. Ces filaments peuvent alors croître dans les microcanaux jusqu'à la chambre de flexion correspondant à un canal rectangulaire où est appliqué un flux afin de défléchir les filaments.

utilisé par Amir et al. [152] sera également modifié pour prendre en compte d'autres éléments spécifiques à notre système. Des simulations numériques à l'aide Comsol ont également été réalisées, d'une part pour choisir certaines caractéristiques de la puce et d'autre part pour valider le modèle théorique.

Les différents paramètres utilisés par la suite sont listés ici :

— r, rayon de l'hyphe en µm

— e, épaisseur de la paroi de l'hyphe en µm

— l, longueur du filament exposée au flux en µm

— η, viscosité du liquide (ici de l'eau, $\eta = 1.10^{-3}$ Pa.s)

— L, largeur de la chambre de flexion en µm

— h, hauteur de la chambre de flexion en µm

— d, distance entre les microcanaux en µm

— Q, débit en $m^3 \cdot s^{-1}$

— f, force par unité de longueur exercée sur le filament en $N \cdot m^{-1}$

— δ(Q), déflexion maximale selon l'axe x du filament à un débit Q donné en µm

— θ, angle global entre le filament et le canal en °

— α, angle au niveau de l'encastrement entre le filament et le canal en °

— EI, module de flexion en $N \cdot m^2$

— E, module de Young en Pa

— I, moment quadratique du filament en flexion par rapport à l'axe x en m^4 ($I = \pi r^3 e$ pour un cylindre creux)

3.2.1 Mise en œuvre expérimentale

Nous allons commencer par décrire le protocole expérimental. Les différentes étapes de la démarche suivie pour les expériences sont illustrées en figure 3.6.

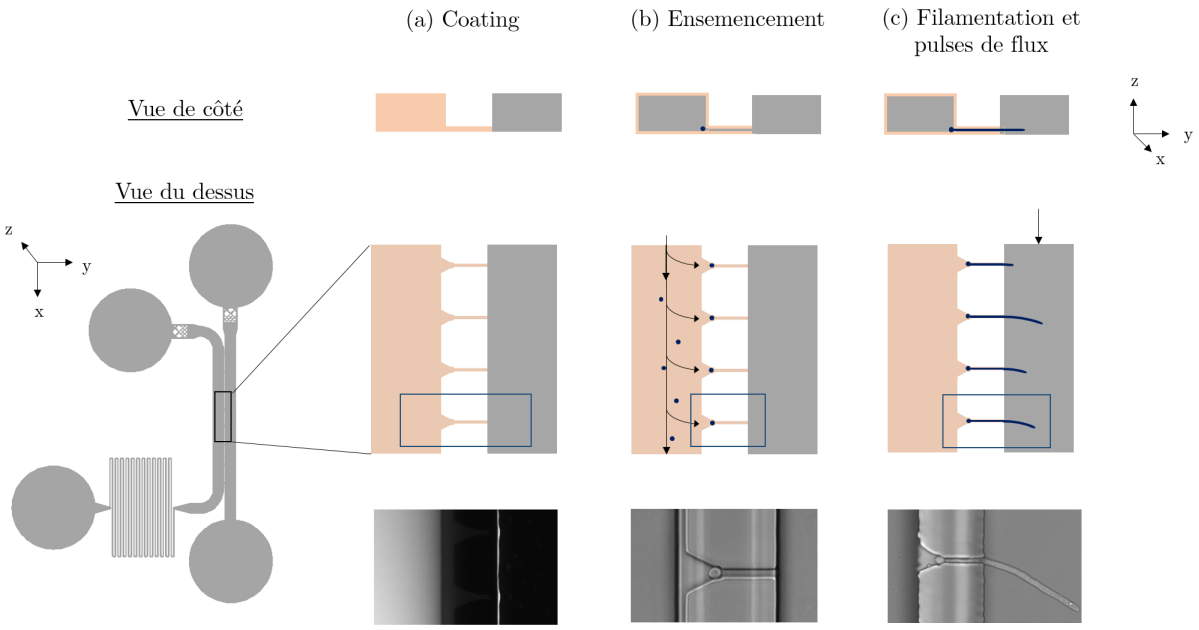


FIGURE 3.6 – Protocole global mis en place pour la mesure de la rigidité des hyphes de *C. albicans*. Des schémas en vues du dessus et de côté sont représentés, ainsi qu'une image représentative pour chaque étape. Le design de la puce, représenté à gauche, utilise le système de positionnement des levures développé en chapitre 2. (a) Dans un premier temps, les canaux subissent un traitement différencié : le canal d'ensemencement peut être rendu adhésif grâce à un coating à la fibronectine. Ici, un exemple de marquage fluorescent (PLL-FITC) a été réalisé pour montrer la possibilité de recouvrir un seul des deux canaux principaux, grâce aux grandes résistances hydrodynamiques des microcanaux. (b) Les levures sont ensuite ensemencées et viennent se placer à l'entrée des microcanaux. (c) La puce est incubée pendant plusieurs heures à 37°C avec un milieu induisant la filamentation. Les hyphes peuvent alors croître dans les microcanaux jusqu'à la chambre de flexion à droite. Un flux contrôlé en débit peut ensuite être appliqué dans ce canal de façon à défléchir les filaments.

Design de la puce

La méthode développée pour les bactéries utilise le dispositif microfluidique appelé "mother machine" [156]. Dans ce système, les cellules-mères sont disposées à l'extrémité de microcanaux fermés. Cela permet de suivre facilement la croissance de bactéries sur de nombreuses générations, qui sont ensuite évacuées grâce à un flux dans le canal principal.

Cependant, ce système n'est pas adapté aux levures, qui n'iraient pas se positionner spontanément dans des canaux fermés, c'est pourquoi il est indispensable d'en modifier la géométrie. Le design global des puces utilisées dans cette étude a déjà été discuté au chapitre 2, et est représenté sur la figure 3.6. Pour rappel, le long serpentin situé à l'extrémité du canal d'en-

semencement permet d'augmenter la résistance hydrodynamique afin de piéger les levures à l'entrée des microcanaux. Ces microcanaux servent ici à guider les hyphes jusqu'à la chambre de flexion, c'est-à-dire le canal dans lequel un flux est appliqué de façon à exercer une force sur les filaments et ainsi les défléchir.

Il est maintenant nécessaire de choisir les dimensions des microcanaux. On utilise d'abord des canaux de largeur et hauteur proches de 2 µm pour permettre aux hyphes de s'y développer facilement, tout en étant confinées. L'effet d'un espace libre trop grand entre un filament et le bord du canal sera discuté dans la suite. La longueur des microcanaux est fixée autour 15 µm, dans le but de donner une direction de croissance aux hyphes en un temps raisonnable. Ainsi, quelques heures sont nécessaires entre l'ensemencement des levures et le début de l'application du flux. Le choix de la distance entre microcanaux sera étudié par la suite à l'aide des simulations numériques.

Coating

Comme on le voit sur le schéma 3.5, les hyphes venant des microcanaux se situent au niveau du sol de la puce. Un potentiel problème résultant de cette situation est l'adhésion, puisque nous avons vu que les hyphes avaient tendance à adhérer facilement aux surfaces. Or pour les besoins de nos expériences, nous souhaitons observer la déflexion des filaments sous l'effet d'un flux, ce qui requiert qu'ils n'adhérent pas à la surface. Des expériences de croissance de filaments dans une puce avec différents types de surfaces ont montré que les hyphes adhéraient très peu sur du verre, tandis qu'elles ont une plus grande affinité pour le PDMS. Cependant, sur une surface entièrement en verre, on voit par exemple sur la figure 3.7a que les filaments peuvent glisser, et ils ne parviendraient donc pas à rentrer dans les microcanaux.

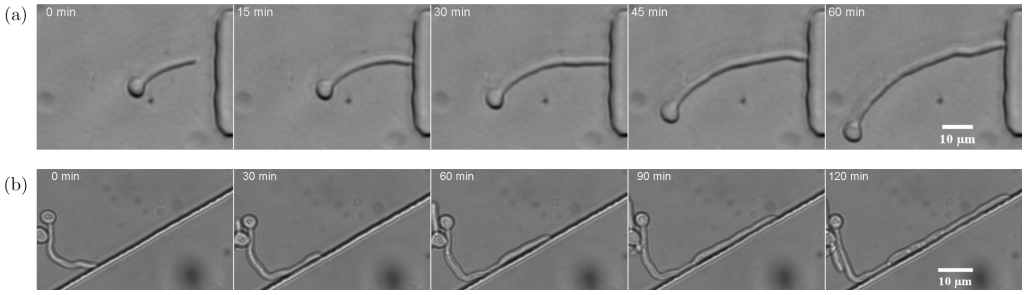


FIGURE 3.7 – Exemples de comportement d'hyphes sur différents substrats. (a) Sur du verre non traité (b) Sur du verre avec un traitement de surface à la fibronectine à $50\,\mu g \cdot mL^{-1}$ pendant 30 minutes.

Notre choix s'est donc porté sur un traitement de surface différencié entre les deux canaux principaux : le canal d'ensemencement doit être plutôt adhésif, contrairement au canal de flexion. Ce coating différencié est permis en particulier grâce aux microcanaux qui ont une résistance suffisamment élevée pour empêcher la propagation d'un liquide de l'autre côté. De plus, le traitement n'est pas effectué immédiatement après le passage au plasma mais plutôt une trentaine de minutes plus tard, ce qui permet aux surfaces d'être un peu moins hydrophiles. Sur la figure

3.6a, l'utilisation de la Poly-L-Lysine (PLL) fluorescente montre qu'il est effectivement possible de traiter les deux canaux principaux de manière différente.

Initialement, la stratégie adoptée était la suivante : une surface en PDMS sans aucun traitement était utilisée dans la partie où les levures sont ensemencées, permettant alors aux hyphes d'adhérer. Le canal de flexion était quant à lui traité avec du PEG silane, qui rend les surfaces non adhésives [157] [158]. Le protocole utilisé a été adapté de ces travaux et consiste à effectuer un mélange de PEG silane et d'éthanol absolu (50/50). Le silane ne doit en aucun cas être en contact avec de l'eau. Une très faible quantité de ce mélange est alors déposée dans le canal en question pendant 5 min à température ambiante. La puce est ensuite rincée plusieurs fois à l'éthanol absolu, puis séchée à 70°C pendant 5 min. L'ensemencement des levures peut alors être effectué.

Dans un second temps, nous avons privilégié l'utilisation d'une surface en verre accompagnée d'un traitement à la fibronectine dans la chambre d'ensemencement, car elle semble fournir de meilleurs résultats tout en enlevant l'étape de *spin-coating* du PDMS. On voit sur la figure 3.7b que les protéines d'adhésion de la fibronectine évitent le phénomène de glissement observé avec le verre. Le traitement du canal d'ensemencement uniquement est un peu plus délicat mais favorise l'entrée des hyphes dans les microcanaux.

Application d'un flux

Après rinçage, les levures sont introduites dans la puce, et notre système de positionnement de levures permet d'en placer une ou plusieurs à l'entrée de la plupart des microcanaux (figure 3.6b). Mais une grande diversité subsiste entre les filaments, que ce soit en terme de vitesse ou de direction de croissance. Ainsi tous les filaments n'atteignent pas la même longueur dans la chambre de flexion en même temps. On décide d'arrêter la croissance des filaments et d'appliquer le flux lorsqu'ils atteignent une longueur moyenne de l'ordre de 30 µm. Au-delà, des branches latérales commencent à croître, et pour de très petits filaments, la déflexion est très faible et donc plus difficilement mesurable. Cela revient à laisser les hyphes croître à 37°C pendant environ 4h après ensemencement dans un milieu inducteur de filamentation. La puce est alors placée à température ambiante le temps de l'expérience de flexion, ce qui permet de freiner la croissance des filaments.

La figure 3.8 montre le principe du montage réalisé pour appliquer un flux contrôlé dans la puce microfluidique de façon à défléchir les filaments (figure 3.6c). La chambre de flexion est connectée à un contrôleur de pression (Flow EZ de Fluigent) ainsi qu'à un débitmètre en amont de la puce. Cela permet de contrôler le flux en débit et non pas en pression. Afin d'obtenir les mesures de déflexion en fonction du débit, des cycles avec incrémentation du débit sont réalisés.

3.2.2 Simulations numériques

Comsol Multiphysics est un logiciel de simulations numériques qui utilise la méthode des éléments finis. Il permet de simuler de nombreux phénomènes physiques, y compris l'hydrodynamique et les interactions fluide-structure qui nous seront utiles ici.

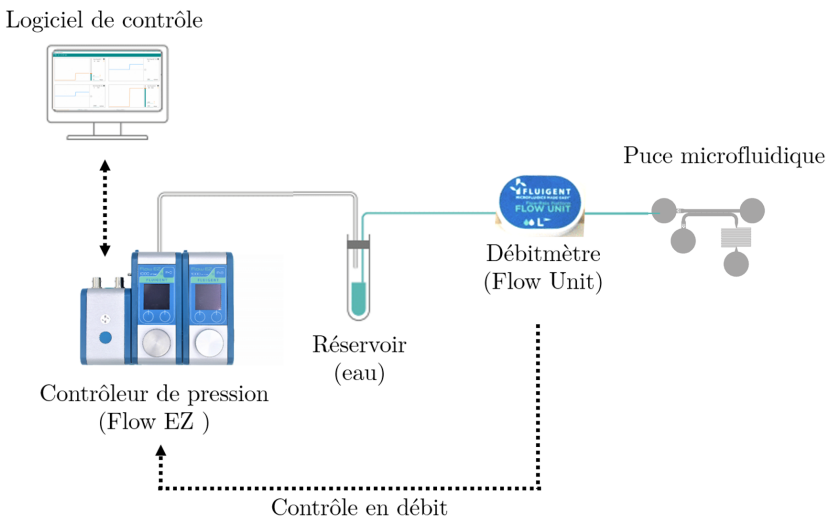


FIGURE 3.8 – Schéma du montage réalisé de façon à contrôler précisément le débit dans la chambre de flexion. Un contrôleur de pression permet de pousser le liquide jusqu'à la puce. Dans notre cas, un débitmètre permet, grâce à une boucle de rétroaction, d'obtenir un contrôle en débit. La pression ainsi que le débit peuvent alors être réglés grâce à un logiciel spécifique.

Construction de la géométrie

Il faut d'abord commencer par construire la géométrie souhaitée. Pour réduire les temps de calculs, on souhaite effectuer les simulations sur une géométrie simplifiée, à savoir un simple canal rectangulaire. Cependant, la véritable géométrie de la puce est plus complexe que ce simple canal et elle contient notamment des microcanaux qui peuvent changer localement le flux dans les zones d'intérêt, même si la grande résistance hydrodynamique de ces microcanaux permet de contenir l'essentiel du flux dans la chambre dédiée à la flexion. Grâce aux simulations numériques, il est possible de déterminer précisément le profil de vitesse : le profil dans un simple canal rectangulaire a par ailleurs été comparé à celui du canal inclus dans la puce complète. La figure 3.9 représente ces deux profils.

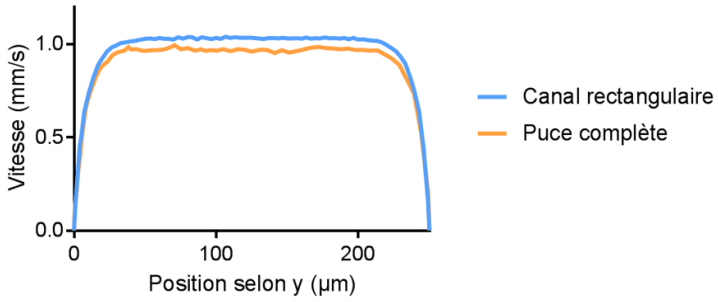


FIGURE 3.9 – Comparaison des profils de vitesse calculés numériquement à l'aide de Comsol. Vitesse en fonction de y à z fixe (z=1 µm). En orange, le profil dans la chambre de flexion au sein de la puce, c'est-à-dire contenant également les microcanaux et les autres entrées et sorties. En bleu, le profil dans un simple canal rectangulaire.

La différence, de l'ordre de 5 %, sera négligée et un simple canal rectangulaire (de dimensions 2000 µm × 250 µm × 30 µm) sera utilisé pour toutes les simulations. L'hyphe est quant à elle modélisée par un cylindre encastré au bord du canal, dont la longueur et l'orientation peuvent être modulées.

Choix du maillage

Après avoir construit la géométrie et défini la physique à utiliser, il faut choisir un maillage approprié. Cette étape est très importante puisque les simulations reposent sur les éléments finis, et différents maillages peuvent donc donner des résultats différents. Un maillage grossier, c'est-à-dire avec des éléments de grande taille, ne peut pas rendre compte précisément de la géométrie en question. En effet, lorsque le maillage n'est pas suffisamment fin, on constate que l'on surestime largement la déflexion du cylindre. Cela correspond alors à sous-estimer la rigidité du filament.

Le choix du maillage réside alors dans le fait de trouver le meilleur compromis entre obtenir des résultats proches de la réalité et éviter un temps de calcul trop important.

Afin de déterminer le maillage optimal, la déflexion d'un filament à paramètres donnés (longueur, module de Young, débit etc) a été déterminée numériquement avec différents maillages. Le logiciel propose des maillages automatiques plus ou moins affinés, et il est également possible de réaliser un maillage manuellement. Ce maillage manuel est effectué en fixant le maillage le plus fin possible au niveau du filament et en l'élargissant au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la zone d'intérêt. On constate sur la figure 3.10a que les valeurs de déflexion (ou plus précisément le ratio déflexion δ sur débit Q qui nous servira à calculer le module de flexion) convergent en affinant le maillage. Si l'on considère que le maillage manuel est le plus performant, on peut également calculer le pourcentage d'erreur par rapport à cette valeur de référence, représenté en figure 3.10b. Finalement, on choisira d'utiliser le maillage automatique 'plus fin' de Comsol qui nécessite un temps moins long de calcul tout en donnant une très bonne estimation du résultat (différence de 0,5%).

Choix de la distance entre microcanaux

La distance entre les microcanaux est un paramètre important, pour lequel il faut trouver un compromis. D'une part, un grand nombre de canaux augmente le nombre d'hyphes à défléchir et par conséquent le rendement de chaque expérience. Cependant, chaque filament modifie localement le profil de vitesse dans le canal, comme le montre la figure 3.11a où les profils de vitesse ont été relevés à différentes distances en aval d'un filament de 40 µm incliné (que l'on voit sur la première image). Ainsi, s'ils sont trop proches les uns des autres, la force exercée et donc la déflexion mesurée seront différentes de la situation idéale où le filament est seul dans le canal, ce qui mènerait à des valeurs erronées de leur rigidité. Pour étudier cet effet, des simulations numériques ont été réalisées. La déflexion d'un cylindre seul a été comparée à la déflexion de plusieurs cylindres successifs espacés d'une distance d. La figure 3.11b représente la différence de déflexion obtenue (en pourcentage par rapport à la valeur du filament seul) en fonction de

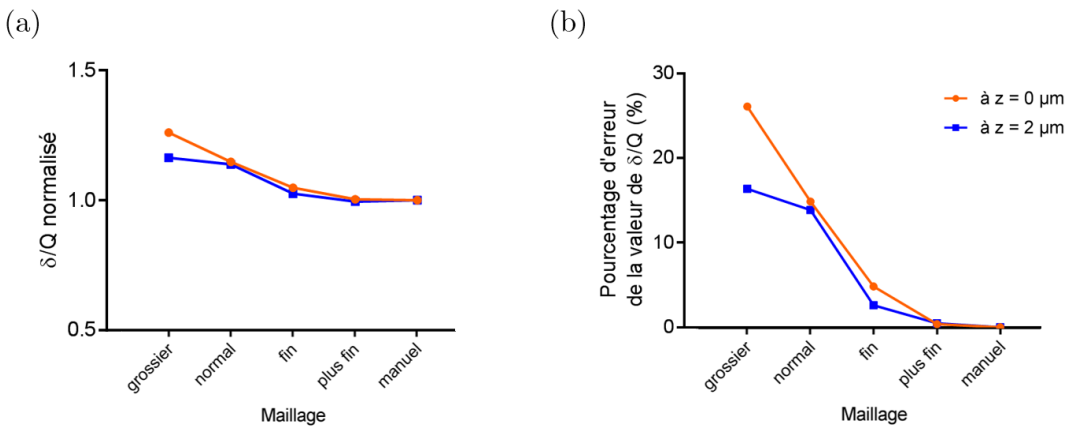


FIGURE 3.10 – Étude de la convergence du maillage pour notre géométrie sur Comsol Multiphysics. Deux exemples sont présentés ici pour deux cylindres de longueur 40 µm et situés à des distances différentes de la surface de la puce. On observe bien que le résultat converge lorsque le maillage est affiné (a) Ratio δ/Q normalisé obtenu en fonction du maillage utilisé. (b) Pourcentage d'erreur de ce ratio δ/Q par rapport au résultat obtenu avec le maillage le plus fin que l'on a pu calculer.

cette distance d. On choisira finalement une distance d entre les microcanaux égale à 40 µm, pour laquelle l'effet des autres filaments est très faible, car même si les seuls filaments pris en compte pour la mesure restent dans le même plan, des filaments inclinés peuvent venir perturber l'écoulement.

3.2.3 Modèle théorique

Les études citées en introduction ont démontré la capacité d'un système microfluidique utilisant des forces hydrodynamiques pour courber des filaments. La mesure de la déflexion associée à cette courbure permet alors de calculer leur module de flexion et en connaissant l'épaisseur de leur paroi, leur module de Young. Nous allons à présent passer en revue les différents éléments nécessaires à la construction du modèle théorique permettant de déduire ces modules de la déflexion de l'hyphe sous flux.

Filaments

Les hyphes ont une forme cylindrique et possèdent une paroi cellulaire qui est principalement responsable de leur rigidité. Ils seront donc considérés ici comme des cylindres creux, de rayon r d'environ 1,1 µm d'après nos mesures expérimentales. L'épaisseur de paroi, notée e sera supposée égale à 200 nm.

Force exercée sur les filaments

On souhaite déterminer la force qui est exercée sur les hyphes par le flux. Si l'on considère uniquement les filaments qui sont posés au sol, alors la force par unité de longueur f est donnée

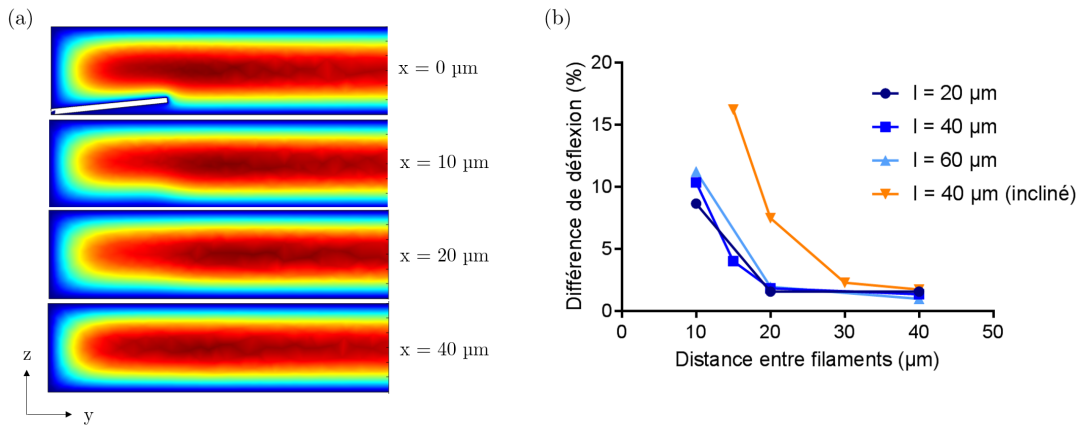


FIGURE 3.11 – Effet de la présence de plusieurs filaments successifs dans la chambre de flexion. (a) Profils de vitesse dans le canal à différentes positions x suivant la présence d'un cylindre incliné de 40 µm. On voit que le profil de vitesse dans la zone d'intérêt est toujours perturbé 10 ou 20 µm après le filament. (b) Différence de déflexion entre une situation où plusieurs filaments sont espacés d'une distance d et une situation avec un seul filament en fonction de cette distance d. Elle est représentée ici pour différentes longueurs l d'hyphes exposées au flux et également pour un filament incliné (ne touchant pas la lame de verre) comme celui de l'image a. Lorsque les filaments sont rapprochés, le flux est perturbé et induit une déflexion différente.

par l'expression suivante [152] [159] :

$$f = 4\pi\eta r \frac{dv}{dz} \tag{3.1}$$

avec $\frac{dv}{dz}$ le gradient de vitesse selon la direction z proche de la surface du canal (c'est-à-dire quand z $\rightarrow$ 0).

Le profil de vitesse dans un canal rectangulaire est calculé numériquement à l'aide de Comsol, et une coupe transversale est représentée en figure 3.12a. On peut ainsi montrer que le gradient de vitesse selon y est effectivement négligeable par rapport à celui selon z dans la zone d'intérêt, comme le montre la figure 3.12b.

Théorie élastique des poutres

Connaissant la force exercée sur un filament, on peut calculer le module de flexion en utilisant la théorie élastique des poutres. Comme nous l'avons expliqué plus haut, les microcanaux servent à maintenir les hyphes pour éviter qu'elles ne se déplacent, et agissent ainsi comme un encastrement. Les filaments sont donc fixés de ce côté, libres de l'autre et soumis à une force perpendiculaire. On s'intéresse uniquement aux déformations élastiques, c'est-à-dire aux déformations réversibles des filaments.

La situation d'une force uniforme le long du filament est représentée sur la figure 3.13a.

Dans ce cas, on obtient l'équation suivante pour le module de flexion EI en fonction de la déflexion δ, la force par unité de longueur uniforme f et la longueur du filament l exposée à la force [160] :

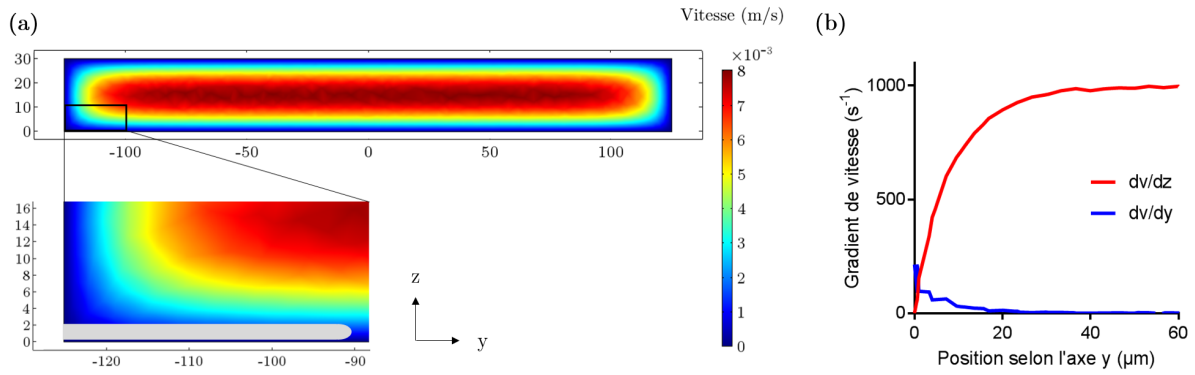


FIGURE 3.12 – Calculs numériques par Comsol des profils et gradients de vitesse dans un canal rectangulaire de hauteur 30 µm et largeur 250 µm. Le calcul a été réalisé ici pour un écoulement avec une vitesse d'entrée de 5 mm · s^{-1}. (a) Profil de vitesse. Un zoom permet de mieux distinguer ce profil dans la zone d'intérêt, c'est-à-dire à la sortie des microcanaux où les hyphes croissent (le cylindre gris représente un filament). (b) Gradients de vitesse dv/dy et dv/dz le long de l'axe y, à z = 1 µm. Pour des filaments de longueur de l'ordre de 30 µm, le gradient selon y est négligeable par rapport à celui selon z.

$$EI = \frac{fl^4}{8\delta} \tag{3.2}$$

Cette équation est obtenue en calculant le moment fléchissant $M(y)$ associé d'une part à la courbure du cylindre de module de Young E et de moment quadratique en flexion I, et d'autre part correspondant à la force à laquelle ce cylindre est soumis. Ces calculs sont détaillés en annexe C.

Force non-uniforme

Cependant, l'équation 3.2 correspond au cas d'une force répartie uniformément sur tout le filament. Étant donné que les hyphes se situent dans un coin du canal, le gradient de vitesse dv/dz et par conséquent la force f par unité de longueur ne sont pas constants le long du filament, comme on le voit sur la figure 3.12.

Pour affiner notre analyse, nous considérons donc une force non-uniforme, en simplifiant tout de même le profil, comme indiqué sur la figure 3.13b. Dans ce cas, une force croissante linéaire (de 0 à f) s'exerce sur une première région $[0\,;l_1]$, puis une force uniforme f sur la portion $[l_1\,;l]$. La longueur l_1 est déterminée en utilisant le profil du gradient de vitesse dv/dz et sera fixée à 15 µm.

En utilisant à nouveau le modèle des poutres élastiques, on peut superposer la déflexion induite par chacune de ces deux composantes (force croissante linéaire et force uniforme) pour obtenir finalement l'expression de la déflexion sous ce profil de force (les détails peuvent également être trouvés en annexe C) :

$$EI = \frac{f}{\delta}\left[\frac{1}{8}l^4 - \frac{1}{6}l_1^3 l + \frac{2}{15}l_1^4\right] \tag{3.3}$$

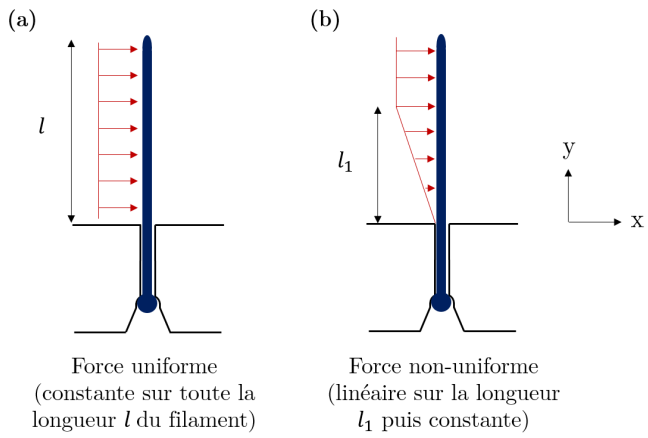


FIGURE 3.13 – Représentation schématique de filaments encastrés par l'intermédiaire des microcanaux et soumis à un force hydrodynamique. (a) Profil de force uniforme sur toute la longueur du filament. Dans nos expériences, les filaments sont en réalité soumis à une force non-uniforme, qui sera simplifiée comme indiqué en (b) (sous la forme d'une augmentation linéaire sur une longueur l_1 puis d'une force constante).

Prise en compte de l'angle initial

Nous avons jusqu'à présent considéré le cas idéal d'un filament qui croît en restant parfaitement aligné avec le microcanal et donc perpendiculaire au flux, c'est-à-dire avec un angle θ égal à 90°, comme indiqué sur le schéma de gauche de la figure 3.14a . Ce cas idéal étant assez rare, il est nécessaire de prendre en compte la variation de l'angle global θ. Pour un angle différent de 90°, la déflexion mesurée est nécessairement plus faible. D'une part, la force est exercée seulement sur une longueur $l' = l \sin\theta$. Et d'autre part, la projection de la déflexion sur l'axe x donne également un facteur $\sin\theta$.

Ainsi la déflexion selon l'axe x d'un filament présentant un angle initial θ avec le canal s'écrit de cette façon :

$$\delta(\theta) = \delta(\theta = 90°) \sin^2\theta \tag{3.4}$$

Des simulations avec Comsol effectuées avec différents angles initiaux permettent de confirmer cette équation, comme l'indique la figure 3.14.

Et l'équation 3.3 établie précédemment est valable pour une force perpendiculaire, par conséquent,

$$EI(\theta) \propto \frac{1}{\delta(\theta = 90°)} \propto \frac{\sin^2\theta}{\delta(\theta)} \tag{3.5}$$

$$EI(\theta) = EI \sin^2\theta \tag{3.6}$$

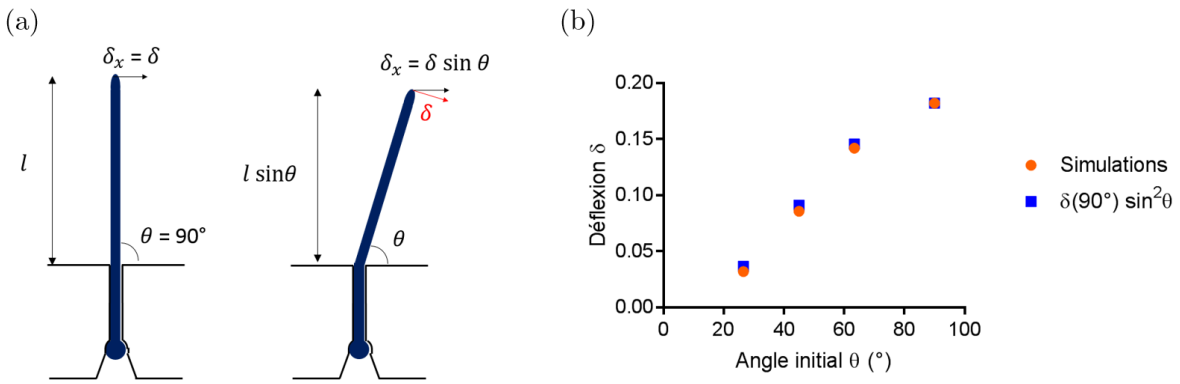


FIGURE 3.14 – Prise en compte de l'angle global θ de l'hyphe avec le canal dans la mesure de la déflexion et donc du module de flexion. (a) Schéma représentatif du cas où l'hyphe est parfaitement perpendiculaire au canal ainsi que du cas où l'hyphe a un angle initial θ avec le canal. (b) Déflexion δ selon x en fonction de l'angle θ du filament avec le canal. On vérifie ici l'équation 3.4 établie préalablement à l'aide des simulations numériques pour des filaments ayant un angle θ différent de 90°.

Problèmes de rotation : obtention d'un meilleur encastrement

La détermination du module de flexion repose ici sur la mesure de la déflexion des hyphes. On souhaite donc s'affranchir de tout autre effet qui induirait un déplacement de l'hyphe.

L'un des principaux problèmes rencontrés pour ces expériences est le fait que les hyphes ne subissent pas uniquement une flexion, mais on observe très souvent une rotation. Une flexion pure implique que les filaments soient encastrés à une extrémité. Or cet encastrement est réalisé par l'intermédiaire des microcanaux qui évitent effectivement de larges déplacements des hyphes. Cependant, il est difficile d'ajuster précisément la largeur de ces microcanaux au diamètre des hyphes. Il est donc fréquent d'avoir des situations pour lesquelles l'hyphe peut légèrement se déplacer latéralement dans le microcanal, et on voit alors une sorte de pivot à ce niveau. Comme le montre la figure 4.35, cela peut avoir pour conséquent l'induction d'une rotation globale du filament, on y voit l'angle local α du filament à la sortie du canal changer avec l'augmentation du débit. Or si l'encastrement était parfait, cet angle ne devrait pas varier.

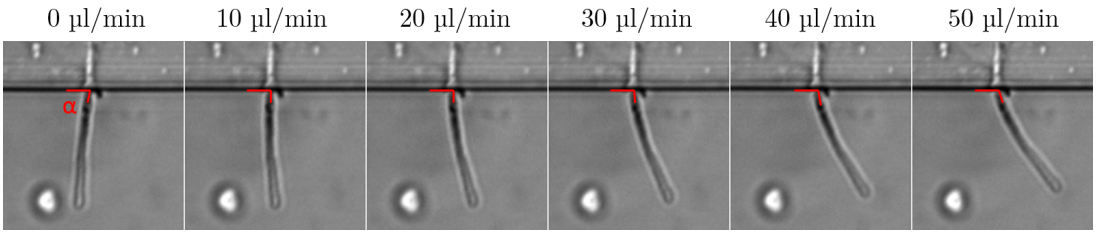


FIGURE 3.15 – Exemple de filament soumis à une augmentation de débit, pour lequel la déformation n'est pas seulement liée à une flexion mais également à une rotation au niveau de la sortie du microcanal. L'angle α au niveau de l'encastrement entre le filament et le bord du canal est indiqué en rouge, et montre bien la rotation.

Le déplacement maximal en x mesuré correspond alors non seulement à la déflexion du filament mais également à la rotation effectuée au niveau du support. On a d'abord envisagé de mesurer ce déplacement engendré par la rotation $dx_{rotation}$ à partir de la mesure manuelle de la variation d'angle entre le filament et le canal (entre l'angle initial α_i et l'angle α à un débit donné).

$$dx_{rotation} = L[cos(\alpha) - cos(\alpha_i)] \tag{3.7}$$

Alors, on peut obtenir le déplacement lié uniquement à la flexion de l'hyphe :

$$\delta_{déflexion} = \delta_{totalmesuré} - dx_{rotation} \tag{3.8}$$

Cependant, l'incertitude de mesure de l'angle α entraîne une grande variabilité sur la mesure finale de déflexion et par conséquent du module de Young.

Pour pallier ce problème, une nouvelle puce a été fabriquée afin d'obtenir un meilleur encastrement des filaments. Pour cela, la hauteur et la largeur des microcanaux ont été réduites à 1,5 µm, c'est-à-dire une taille plus petite que le diamètre des hyphes pour s'assurer qu'elles ne puissent plus bouger dans ces microcanaux. Mais réduire la taille des microcanaux réduit aussi la probabilité que les hyphes y pénètrent. Ainsi une hauteur de canal intermédiaire de 3 µm a été introduite afin de faciliter le placement des levures et la croissance des hyphes dans cette direction. Une image de ces nouveaux microcanaux est représentée en figure 3.16 où l'on voit les différentes hauteurs de canaux.

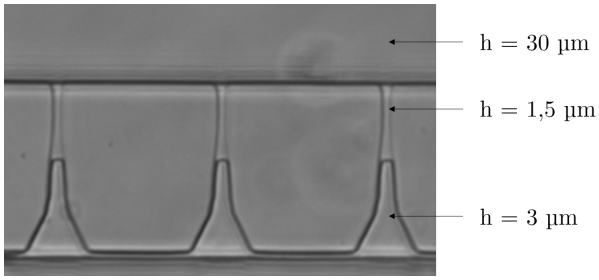


FIGURE 3.16 – Vue du dessus des microcanaux à 2 couches. La partie très étroite de 1,5 µm de large et de haut est destinée à obtenir un meilleur encastrement des hyphes, de façon à ce que leur déformation corresponde uniquement à de la flexion. La zone plus large, de hauteur 3 µm et en forme d'entonnoir, sert de transition et permet le positionnement les levures ainsi que le début de croissance des hyphes. Ces canaux et l'alignement de précision des 2 épaisseurs de résine ont été réalisés avec un équipement d'écriture directe par laser (µPG, Heidelberg) comme expliqué en chapitre 2.

Dans cette nouvelle situation, l'angle α entre les hyphes et le canal reste plus souvent constant quelque soit le débit, ce qui permet d'avoir un déplacement du filament uniquement dû à la flexion. À noter toutefois que l'on a perdu en rendement car les hyphes ont tout de même plus de mal à rentrer dans ces microcanaux. C'est pour cette raison que l'on a changé de stratégie de traitement de surface en utilisant de la fibronectine dans la chambre d'ensemencement, ce qui

les empêche de glisser sur la surface.

Même si nous sommes parvenus à réduire l'effet de cette rotation, elle reste néanmoins présente, et est prise en compte lorsque cela est possible par la soustraction angulaire expliqué plus haut. On ne peut cependant négliger le fait que cela crée une incertitude supplémentaire sur les valeurs de rigidité obtenues.

3.3 Résultats sur la rigidité des hyphes

3.3.1 Mesure du module de flexion et module de Young

Dans un premier temps, des expériences ont été réalisées avec la souche de référence SC5314 de *C. albicans*. Comme indiqué précédemment, des cycles d'augmentation et diminution de débit sont effectués. Un exemple d'images acquises pour chaque débit est représenté en figure 3.17. On y voit le filament se défléchir au fur et à mesure que le débit, donc la force exercée, augmente. La déflexion selon l'axe x, δ, est ensuite mesurée et tracée en fonction du débit Q, comme sur la figure 3.18.

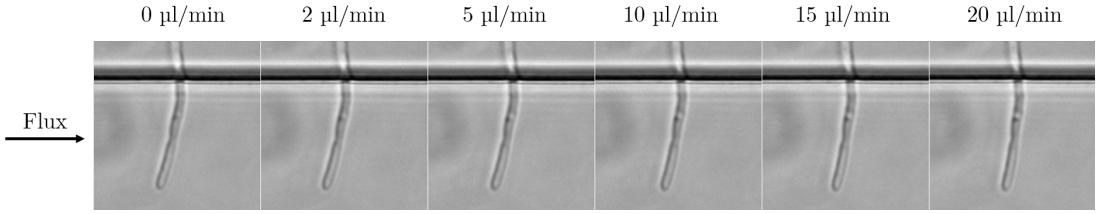


FIGURE 3.17 – Exemple représentatif d'images montrant un filament soumis à un flux à débit variable. On observe l'augmentation de la déflexion au fur et à mesure que le débit augmente.

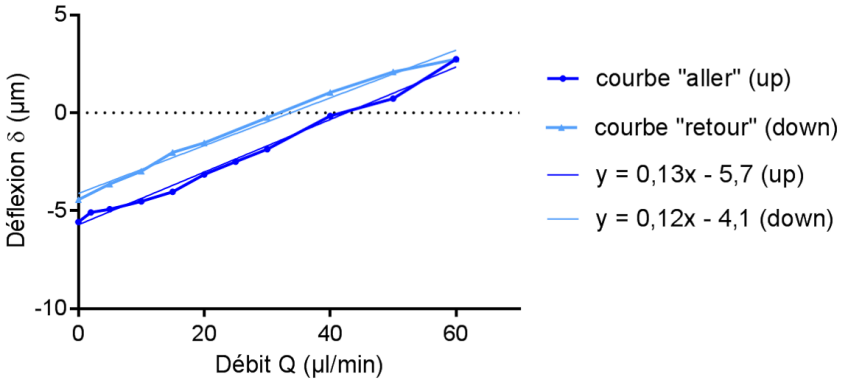


FIGURE 3.18 – Déflexion (en µm) en fonction du débit (en $\mu L \cdot min^{-1}$) pour l'hyphe représentée en figure 3.17. Un cycle complet d'augmentation puis de réduction du débit est réalisé en mesurant à chaque fois la déflexion. On constate ici que les deux courbes sont très proches, avec une très faible hystérésis.

S'il s'agit bien d'une déformation élastique, on doit obtenir une unique droite pour l'augmen-

tation et la diminution de débit. Au contraire, si les deux courbes ne se superposent pas, cette hystérésis peut traduire un phénomène plastique pour lequel le filament a été déformé durablement et ne revient pas à son état initial. Cela concerne surtout les trop grandes déformations. Il peut également s'agir d'un déplacement de l'hyphe au niveau du microcanal qui peut induire une asymétrie entre l'aller et le retour. Pour la figure 3.18, il y a un léger décalage entre les deux courbes, mais les deux pentes restent très similaires.

Dans certains cas, on peut obtenir une courbe telle que représentée en bleu sur la figure 3.19, qui n'est pas linéaire et pour laquelle on ne peut donc pas extraire une unique pente δ/Q. Cependant, comme expliqué dans la partie précédente, il faut prendre en compte l'angle global de l'hyphe avec le canal θ car on voit que celui-ci change drastiquement au cours de la déflexion. Il est alors possible de corriger ces courbes en mesurant l'angle θ au fur et à mesure de l'augmentation du débit, et en utilisant l'équation 3.4. Pour le cas de la figure 3.19, on obtient alors la courbe en orange à partir de laquelle on peut déterminer une pente.

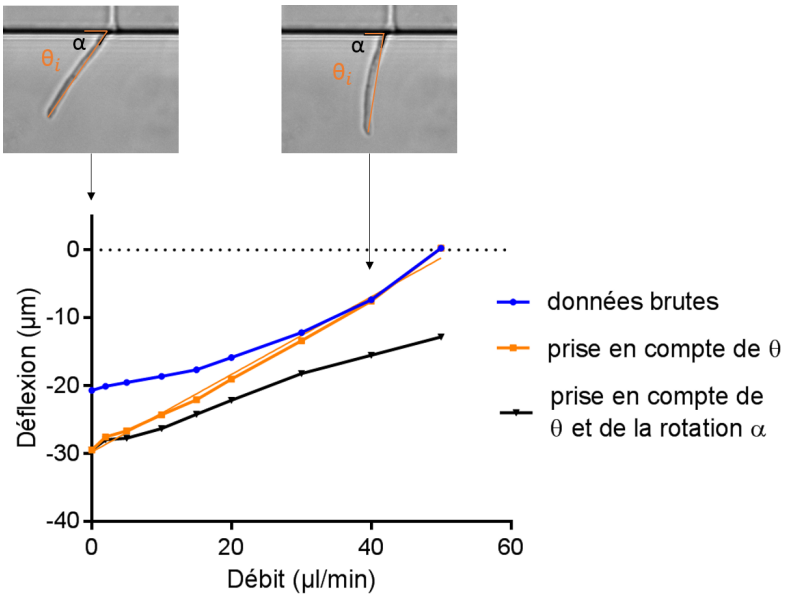


FIGURE 3.19 – Déflexion δ en fonction du débit Q pour un filament soumis à un flux. La courbe bleue, qui correspond aux données mesurées, n'est pas linéaire, ce qui ne permet pas de déterminer la pente δ/Q nécessaire pour le calcul du module de flexion. Les images de l'hyphe en question montre que l'angle global θ varie largement au cours de l'augmentation du débit. En utilisant l'équation 3.4 et en mesurant l'angle à chaque instant, on peut tracer la courbe orange pour laquelle on peut extraire la pente. A cela s'ajoute les effets de rotation qu'il faut également prendre en compte en mesurant l'angle α au niveau de l'encastrement. Cela mène à une diminution de la pente δ/Q comme indiqué avec la courbe noire.

On peut également tenter d'éliminer les effets de rotation en mesurant l'angle α à la base du filament et à l'aide des équations 3.7 et 3.8. La courbe (représentée en noir) a alors une pente plus faible, car sans prendre en compte la rotation, on surestime les valeurs de déflexion.

On trouve finalement un module de flexion EI moyen égal à 6,5 $\mu N \cdot \mu m^2$ (n = 52). En utilisant un rayon de filament moyen mesuré r = 1,1 µm, ainsi qu'une valeur de 200 nm pour

l'épaisseur de la paroi rigide e, on en déduit un module de Young E égal à 7,8 MPa.

3.3.2 Effet d'un antifongique

Maintenant que nous avons montré la façon dont on peut mesurer la rigidité de la paroi des hyphes à l'aide d'outils microfluidiques, nous souhaitons mettre à l'épreuve cet outil. Plusieurs possibilités s'offrent à nous : d'une part, l'étude de mutants spécifiques de la paroi dont la composition et donc la rigidité peuvent varier ; ou d'autre part, l'étude d'antifongiques dont l'action cible spécifiquement la paroi. Concernant ce point, plusieurs travaux se sont intéressés à l'effet de la caspofungine sur les levures de *C. albicans* [130] [129]. Rappelons ici que la caspofungine est un antifongique qui agit en inhibant la synthèse de β-glucanes, composants essentiels de la paroi. Les mesures par AFM semblent indiquer qu'à faible concentration, la caspofungine n'affecte pas significativement la rigidité des levures [130], voire entraînerait même une augmentation de la rigidité [129]. Cela soutiendrait donc l'hypothèse d'un mécanisme de compensation : en présence d'inhibiteur de β-glucanes, la proportion d'un autre constituent de la paroi, la chitine, augmente. Cependant, les levures soumises à de fortes concentrations de caspofungine ne seraient plus capables de compenser et alors leur module de Young diminue [130].

Nous proposons ici d'utiliser notre système microfluidique afin d'étudier la réponse des hyphes à un traitement antifongique tel que la caspofungine. Pour cela, une première mesure de rigidité est effectuée sur les hyphes. La puce est ensuite placée à nouveau à 37°C avec le milieu de culture auquel la caspofungine est ajoutée à $1\,\mu g \cdot mL^{-1}$ pendant 30 minutes. Les hyphes sont alors à nouveau soumises à un flux afin de déterminer si leur rigidité est modifié par ce traitement. La figure 3.20 montre le même filament qu'en figure 3.17 après 30 min en présence de caspofungine. On constate que de faibles débits entraînent une déformation beaucoup plus importante qu'avant le traitement antifongique. Notons toutefois que cette déformation n'est pas uniquement le résultat d'une flexion mais également d'une rotation du filament au niveau du support, particulièrement visible au-delà de $10\,\mu L \cdot min^{-1}$.

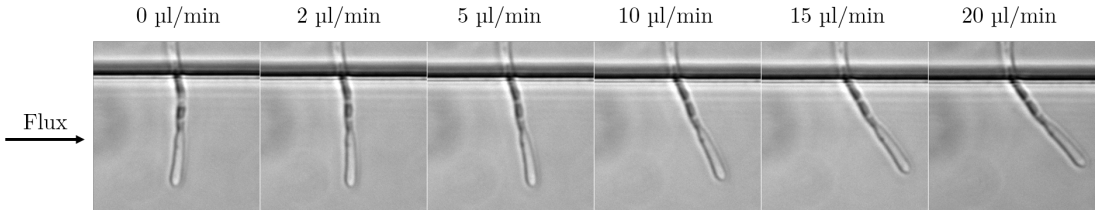


FIGURE 3.20 – Exemple représentatif d'images montrant le filament de la figure 3.17 soumis à un flux à débit variable, après un traitement avec de la caspofungine à $1\,\mu g \cdot mL^{-1}$ pendant 30 minutes. La déformation du filament est nettement plus importante qu'elle ne l'était avant traitement, et est constituée à la fois d'une flexion et d'une rotation.

La courbe de déflexion en fonction du débit sans traitement montrée en figure 3.18 est comparé à celle obtenue après l'incubation en présence de caspofungine sur la figure 3.21. On voit effectivement que ce traitement entraîne une forte augmentation de la pente δ/Q (qui n'est pas seulement liée à la rotation) et donc une forte diminution de la rigidité du filament.

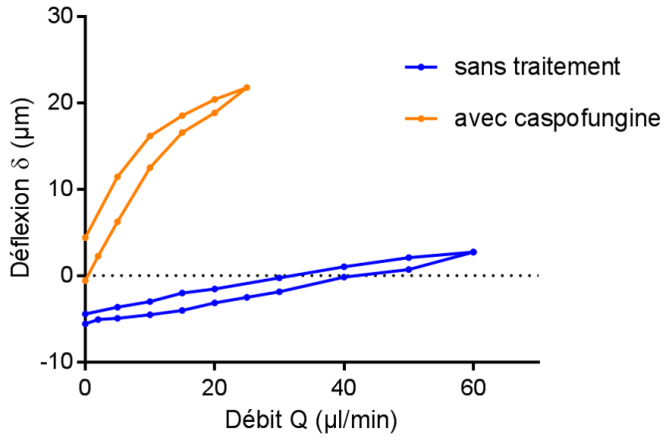


FIGURE 3.21 – Déflexion δ en fonction du débit Q pour un filament soumis aux pulses de flux une première fois sans aucun traitement (courbe bleue), puis une seconde fois après incubation avec la caspofungine (courbe orange).

Les valeurs obtenues avec et sans traitement antifongique sont reportées sur la figure 3.22. Quelques expériences contrôles ont également été menées sans caspofungine, en plaçant la puce à nouveau à 37°C pendant 30min dans leur milieu de culture afin de vérifier que le premier cycle de pulses n'influençait pas les valeurs obtenues.

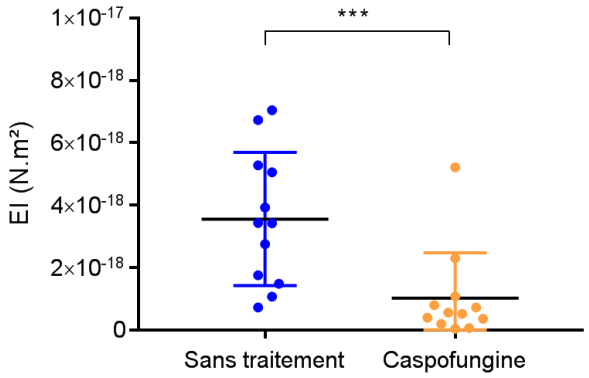


FIGURE 3.22 – Valeurs de module de flexion EI obtenues pour la souche de référence SC5314 d'abord sans traitement puis avec un traitement antifongique à la caspofungine à $1\,\mu g \cdot mL^{-1}$ pendant 30min (n = 12 dans 8 puces différentes). Les moyennes et écart-types sont représentées sur ce graphe, et le test statistique utilisé est le test non paramétrique apparié de Wilcoxon.

Après avoir été soumis au traitement antifongique, les hyphes sont systématiquement plus sujets à la rotation. D'une part, on peut se demander si le diamètre de l'hyphe n'est pas légèrement modifié par ce traitement. Ainsi, une réduction du diamètre peut mener à de plus grands déplacements dans le microcanal. D'autre part, la caspofungine semble fragiliser globalement les hyphes, mais plus spécifiquement les septums qui peuvent alors devenir des points de pivot. Il peut en être de même pour les points de contact avec les parois, qui sont les endroits soumis

aux plus grands stress.

Néanmoins, les effets de rotation ont été pris en compte ici lorsque nécessaire, et on voit sur la figure 3.22 que la caspofungine réduit de façon significative le module de flexion de la paroi des hyphes.

3.3.3 Comparaison avec une autre souche

Nous souhaitons comparer ici la rigidité de la souche de référence SC5314 à celle d'une souche ayant subi une mutation affectant sa paroi. Afin de mener à bien notre étude, il est toutefois nécessaire que cette souche puisse croître sous la forme hyphale également, il faut donc éviter d'affecter des protéines indispensables à cette morphogénèse.

Certaines des protéines Pga (*GPI-anchored protein*) sont ancrées dans la paroi cellulaire par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol). La délétion simultanée des gènes de deux de ces Pga, Pga59 et Pga62, n'a pas d'impact majeur sur la croissance hyphale, mais induit une modification de la structure de la paroi [114]. Nous avons donc cherché à déterminer si ces délétions modifiaient également la rigidité des hyphes. La figure 3.23a compare les valeurs de module de flexion obtenues pour la souche de référence SC5214 avec ceux de la souche $\Delta\Delta pga59\Delta\Delta pga62$.

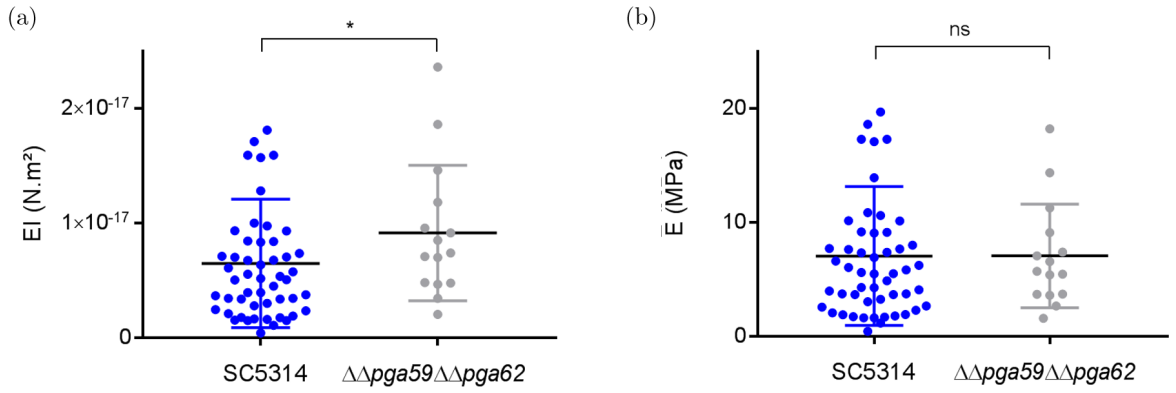
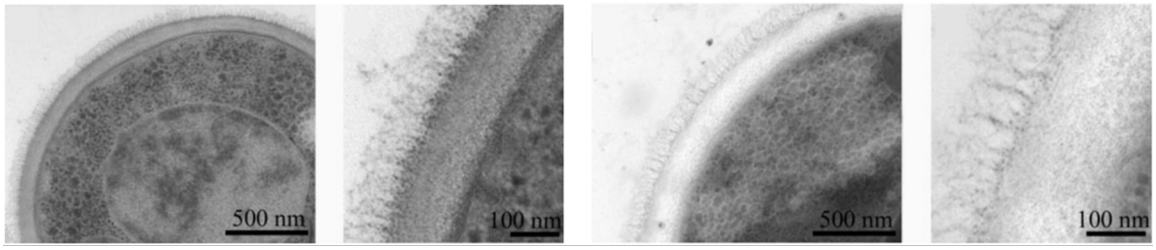


FIGURE 3.23 – Comparaison des valeurs de module de flexion EI (a) et de module de Young E (b) obtenues pour la souche de référence SC5314 (n = 52 dans 18 puces différentes) et de la souche $\Delta\Delta pga59\Delta\Delta pga62$ (n = 15 dans 7 puces différentes). Les moyennes et écart-types sont représentées sur ce graphe, et le test statistique utilisé est le test non paramétrique Mann-Whitney.

Le faible de nombre de mesures pour le mutant nous permet difficilement de conclure, mais il semble que le module de flexion de ce mutant soit en moyenne légèrement plus élevé que celui de la souche de référence. Pour calculer ensuite le module de Young E, il est nécessaire de connaître l'épaisseur de la paroi e. Or des images de microscopie électronique, représentées en figure 3.24, réalisées dans une étude précédente nous donne une estimation de ce paramètre [114]. La souche BWP17 dérive de SC5314 mais est rendue auxotrophe pour certains acides aminés, et l'épaisseur de sa paroi est environ égale à 220 nm. Le double mutant quant à lui a une composition de paroi

assez différente dont l'épaisseur est d'environ 310 nm.



(a) BWP17 (b) ΔΔPga59ΔΔPga62

FIGURE 3.24 – Images de microscopie électronique en transmission (TEM) de BWP17, à priori similaire à SC5314, ainsi que du mutant $\Delta\Delta pga59\Delta\Delta pga62$. [114].

Notons tout de même que ces images ont été réalisées pour des levures qui, de plus, se sont développées dans un milieu différent du nôtre, ce qui peut induire des modifications notables dans la structure de la paroi [27]. Par conséquent, elles ne fournissent véritablement pas les épaisseurs de paroi des hyphes, mais si l'on suppose qu'elles évoluent de la même façon, alors on peut calculer le module élastique E. On voit sur la figure 3.23b qu'il n'y a alors plus de différence significative. Cela signifie que la différence obtenue pour le module de flexion EI est compensée par la différence d'épaisseur de paroi pour retrouver finalement une rigidité de paroi similaire.

3.4 Caractérisation de la force exercée par les hyphes

Dans le but de caractériser au mieux les propriétés mécaniques des hyphes, nous avons également cherché à mesurer la force qu'elles exercent. Dès les premières expériences, nous avons constaté que celle-ci était très importante, les filaments étant même capables de déformer les canaux en PDMS. Pour cela, un système microfluidique, schématisé en figure 3.25 impliquant un piston a été envisagé. Il s'agit de créer un objet mobile à l'intérieur d'un canal. L'application d'une pression peut alors le faire coulisser dans ce canal à l'image d'un piston. Afin de maintenir le piston dans le canal, celui-ci est réalisé avec des constrictions de part et d'autre. On utilise des microcanaux de largeur 10 µm et hauteur 3 µm. La croissance d'hyphes dans ces canaux entraînerait, par l'intermédiaire de la force développée à l'apex, le mouvement des pistons. En modulant la pression à l'autre extrémité, ce système permettrait de déterminer la courbe force-vitesse des hyphes ainsi que la pression maximale qu'elles exercent. Contrairement aux autres méthodes présentées en introduction qui implique la déformation de PDMS sous l'effet des filaments, celle-ci présente l'avantage d'être modulable et de pouvoir agir directement sur les hyphes par l'intermédiaire de ce piston. Mais comme nous le verrons dans la suite, cette technique est également plus difficile à contrôler.

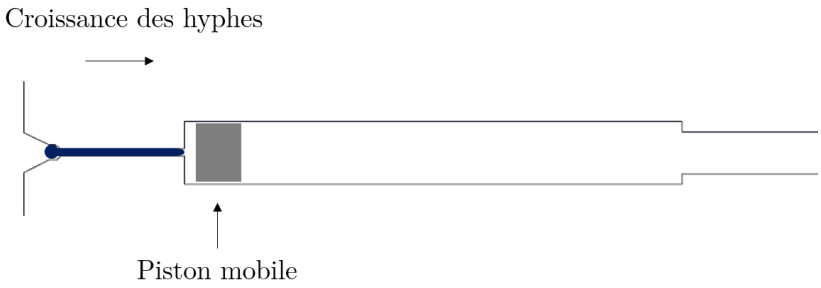


FIGURE 3.25 – Représentation schématique de la méthode envisagée pour mesurer la force exercée par les hyphes : un objet mobile à l'intérieur du canal, assimilable à un piston, permet d'appliquer une pression opposée à celle exercée par les hyphes.

3.4.1 Méthode de fabrication : *stop-flow lithography*

Pour réaliser ces objets mobiles directement à l'intérieur d'une puce en PDMS, on utilise une technique appelée *stop-flow lithography* [161]. Le principe, représenté sur la figure 3.26, est de photopolymériser des particules, de forme et taille définies à l'aide d'un masque, à l'intérieur d'une puce.

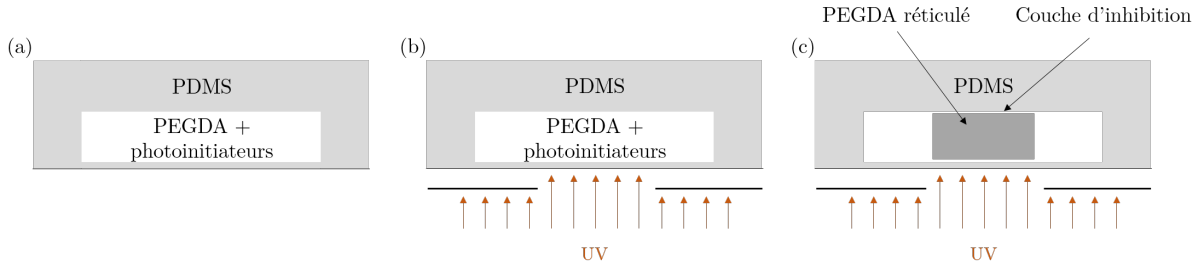


FIGURE 3.26 – Procédé de fabrication des pistons par photopolymérisation à l'intérieur des puces. (a) Le polymère liquide (PEGDA) est mélangé à des photoinitiateurs et inséré dans la puce. (b) La lumière UV est dirigée dans des régions spécifiques, par l'intermédiaire d'un masque, comme représenté sur le schéma, ou d'un réseau de micro-miroirs dans le cas du système Primo. (c) Cette lumière UV ainsi que la présence de photoinitiateurs permettent la réticulation localisée du polymère. La présence de parois en PDMS facilite la diffusion de l'oxygène qui inhibe la réaction de polymérisation, créant donc un espace libre entre le polymère réticulé et les parois. C'est la présence de cet interstice qui permet à l'objet de coulisser dans le canal.

Dans un premier temps, des photoinitiateurs sont ajoutés au polymère, ici du PEGDA (PolyEthylène Glycol Diacrylate), puis le mélange est injecté dans la puce. Lorsque le liquide est stabilisé, c'est-à-dire qu'il n'y a plus aucun flux, la lumière UV combinée à un masque permet de polymériser une région spécifique. Dans notre cas, nous utilisons le système Primo développé par Alvéole qui permet d'effectuer des photolithographies, photopatternings ou photopolymérisations sans masque mais à l'aide d'une lumière façonnée par des micro-miroirs (DMD). La lumière UV permet donc la réticulation du polymère dans la zone spécifique uniquement. Le polymère non-réticulé, et donc les radicaux libres, doivent ensuite être évacués par rinçage de la

puce. Cette étape est très importante pour la survie des champignons dans la suite de l'expérience.

Toutefois, le principal critère pour l'obtention d'un piston est le fait qu'il doit être mobile dans le canal. Cette caractéristique est réalisable grâce aux couches d'inhibition liées à l'oxygène. En effet, le PDMS étant perméable aux gaz, l'oxygène peut diffuser au niveau des parois et réagir avec les radicaux, ce qui inhibe la réaction de polymérisation [162]. Par conséquent, une fine couche de PDMS est également déposée par *spin-coating* sur une lamelle de verre afin d'obtenir des canaux uniformément en PDMS et donc des couches d'inhibition sur chaque paroi.

3.4.2 Paramètres à contrôler

Pour cette photopolymérisation, de nombreux facteurs entrent en jeu. L'effet de certains paramètres sur l'épaisseur de la couche d'inhibition notamment a été étudié [162]. On peut citer la concentration de photoinitiateurs, la quantité de photons envoyés, donc la puissance du laser ainsi que le temps d'exposition, ou encore la concentration d'oxygène.

La figure 3.27 montre effectivement l'effet du temps d'exposition à la lumière UV sur la forme de la particule polymérisée. On voit bien que selon cette durée, on peut passer d'un objet sous-polymérisé, complètement flottant et n'ayant aucun contact avec la paroi à un objet sur-polymérisé, formant quant à lui un bouchon et n'étant pas mobile.

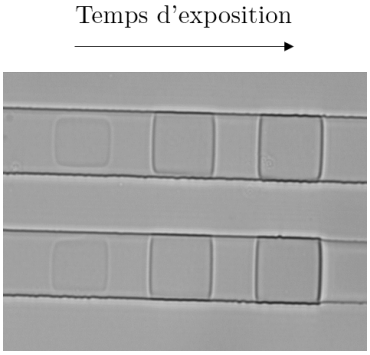


FIGURE 3.27 – Exemple de photopolymérisation au sein d'un canal. Plusieurs objets ont été polymérisés successivement avec différents temps d'exposition résultant en des structures très différentes, allant de l'objet flottant au bouchon immobile.

L'obtention d'un piston coulissant mais espacé le moins possible des parois est donc un défi important. Le contrôle de cette épaisseur d'inhibition est très difficile car on se place ici à de faibles dimensions : on souhaite que les couches d'inhibition fassent seulement quelques centaines de nanomètres (dans des canaux de $3\,\mu m \times 10\,\mu m$).

Le premier point d'amélioration consiste à choisir la meilleure méthode de fabrication des moules pour ces puces. Comme expliqué en chapitre 2, l'utilisation de la photolithographie par masque produit des canaux avec une rugosité apparente. Certaines de ces rugosités peuvent empêcher le mouvement des pistons dans les canaux, c'est pourquoi nous avons ensuite réalisé les moules avec une technique de photolithographie directe. Cela nous a permis d'avoir des

canaux beaucoup plus lisses.

La concentration d'oxygène est un paramètre particulièrement important puisqu'il conditionne l'épaisseur de la couche d'inhibition. Or le scellement des puces s'effectue à l'aide d'un traitement au plasma. Celui-ci affecte les propriétés de surface par oxydation, et rend notamment les surfaces hydrophiles. Il a été montré que suite à un traitement plasma, il y a une évolution temporelle des caractéristiques physiques des surfaces. Le PDMS reprend par exemple ses propriétés hydrophobes et la diffusivité de l'oxygène augmente progressivement [163]. Pour une meilleure reproductibilité, il est donc préférable de se placer à un moment où les variations de ces caractéristiques sont très faibles, c'est-à-dire quelques jours après le scellement par plasma.

Lorsque les objets sont polymérisés, ils se déplacent facilement dans les canaux lorsque le milieu est toujours composé du PEGDA liquide. La figure 3.28 montre un exemple de kymographe sur lequel un piston coulisse dans le canal sous l'effet d'une pression.

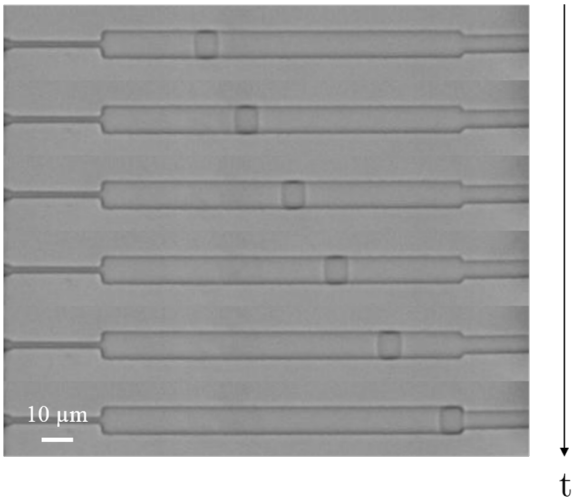


FIGURE 3.28 – Images séquentielles montrant la capacité du piston à se déplacer à l'intérieur du canal microfluidique sous l'effet d'un flux appliqué avec un contrôleur de pression.

Lors du premier rinçage de la puce à l'éthanol, les pistons continuent de se déplacer. Malheureusement, nous nous sommes rendus compte que lors du second rinçage avec de l'eau, les pistons ne se déplacent plus. Plusieurs tests ont effectivement révélé qu'en milieu aqueux, la capacité des pistons à glisser dans le canal est altérée. On peut supposer qu'il y a alors un contact solide-solide entre la particule polymérisée et les parois en PDMS, tandis qu'une couche de lubrification lui permet de bouger dans le polymère liquide et l'éthanol. Afin de remédier à ce problème, nous avons testé un changement de polymère, plus précisément nous avons utilisé du PEGDA avec un poids moléculaire plus élevé car celui que nous utilisions initialement (PEGDA 250) est insoluble dans l'eau [164]. Des traitements de surface ont été envisagés afin de rendre les parois plus hydrophiles, comme des coatings avec du silane. Ces modifications semblent prometteuses, mais de nouvelles expériences ainsi qu'une caractérisation plus systématique seraient nécessaires pour le confirmer.

3.4.3 Interaction avec les hyphes

Après un rinçage intensif de la puce pour enlever tout résidu de photoinitiateurs, les levures ainsi que le milieu inducteur de filamentation peuvent être injectés. Toutefois, la présence de pistons dans les microcanaux augmente drastiquement leur résistance hydrodynamique. Cela signifie qu'il est beaucoup plus difficile de positionner les levures à l'entrée des microcanaux.

Même sans optimiser ce piégeage, nous avons pu observer à plusieurs reprises la croissance d'hyphes au niveau de pistons. Dans quelques situations, les filaments ont pu déplacer légèrement le piston. Cependant, dans la plupart des cas, on peut observer que les hyphes ont plutôt tendance à passer sur les côtés, c'est-à-dire entre le piston et les parois du canal. On constate en effet, dans cette situation comme dans d'autres détaillées dans cette thèse, que les filaments privilégient une croissance dans des interstices, en longeant des parois, plutôt qu'une véritable pénétration ou ici l'exertion d'une force face à une paroi. Face à ce problème, nous avons envisagé d'ajouter une sorte d'encoche au piston afin de bloquer l'apex de l'hyphe pour la contraindre à croître dans cette direction.

3.5 Discussion et perspectives

Nous nous proposons ici de discuter les points forts et points faibles de ces méthodes de caractérisation mécanique, ainsi que d'éventuelles possibilités d'amélioration, ou d'autres applications possibles.

3.5.1 Discussion

D'une part, nous avons développé un système microfluidique permettant d'obtenir une mesure de la rigidité de paroi de champignons filamenteux. Nous avons obtenu ici un module de Young de la paroi des hyphes de *C. albicans* de l'ordre de 8 MPa. Cette valeur est cohérente avec de précédentes mesures, car elle est en fait intermédiaire entre celles obtenues pour les levures par AFM et celles déduites par déformation de *S. pombe* par exemple. L'utilisation de la caspofungine nous permet de vérifier l'efficacité de notre système, en montrant une réduction d'un facteur 4 environ du module de flexion EI, ce qui est cohérent avec d'autres travaux déjà cités précédemment [130]. Il est également intéressant de constater que la souche avec délétion de protéines de la paroi semble conserver une rigidité de paroi équivalente à la souche sauvage. La modification de sa composition, montrée par ailleurs [114], induit certes une augmentation de l'épaisseur de paroi et par conséquent une augmentation du module de flexion, mais le système semble pour autant assez robuste en ce qui concerne le module de Young. De nouvelles expériences, ainsi qu'une mesure de l'épaisseur de paroi dans ces conditions, sont néanmoins nécessaires pour valider ces résultats préliminaires.

L'utilisation de la caspofungine donne également lieu à diverses interrogations, notamment sur son mode d'action. En effet, on sait qu'en inhibant la synthèse de β-glucanes, on empêche l'hyphe de poursuivre sa croissance, mais comment cela affecte-t-il la partie de l'hyphe déjà formée ? La réduction du module de flexion par ce traitement signifie qu'il n'agit pas uniquement

au niveau de la formation de la nouvelle paroi à l'apex. Or le consensus actuel semble converger vers une très faible proportion de renouvellement de la paroi formée pour les levures de *S. cerevisiae* ou *C. albicans* [24].

Il serait aussi nécessaire de combiner ces expériences à une mesure de l'épaisseur de paroi des hyphes dans le milieu de culture utilisé, ainsi que pour les souches utilisées. En effet, on s'est basé ici sur une épaisseur de paroi standard de l'ordre de 200 nm, mais l'épaisseur de paroi, et par conséquent le module de Young, varient selon le milieu de culture utilisé [27]. Les valeurs du module de flexion EI au contraire, ne dépendent pas cette épaisseur. Ne connaissant pas le changement d'épaisseur de paroi lors d'un traitement à la caspofungine, nous ne pouvons donc pas comparer le module de Young.

D'autre part, un autre dispositif microfluidique impliquant la photopolymérisation de structures au sein des microcanaux a commencé à être développé, dans le but de pouvoir appliquer une pression contrôlée à la pointe des hyphes. Le développement de cette technique nécessiterait encore un travail conséquent de calibration afin de contrôler précisément tous les paramètres, et d'obtenir des pistons de façon reproductible. Un traitement de surface semble produire des résultats intéressants en ce qui concerne la mobilité des pistons dans un milieu aqueux, mais cela devrait être également approfondi. Enfin, il resterait également à trouver un moyen de diriger les hyphes face au piston, et d'éviter qu'ils se glissent entre le piston et les parois, ce qui est assez compliqué compte-tenu de la tendance des hyphes à toujours privilégier une situation de confinement, comme on le verra plus en détail dans le chapitre 4.

3.5.2 Limitations de la mesure de rigidité

La principale limitation de cette méthode réside dans son faible rendement. Initialement, l'objectif était de développer une technique *high-throughput*, c'est-à-dire à haut débit, afin de pouvoir cribler un large panel de mutants. Cependant, plusieurs points limitent l'obtention de grandes quantités de données.

D'une part, nous avons montré qu'il était nécessaire d'avoir un véritable encastrement, autrement dit qu'il n'y ait pas d'espace libre entre les hyphes et les parois des microcanaux. Cependant, ce niveau de confinement élevé a tendance à freiner l'entrée des hyphes dans ces microcanaux, ce qui limite le nombre d'hyphes arrivant dans la chambre de flexion. Il est envisageable de fabriquer une nouvelle puce dans laquelle le confinement serait encore plus graduel. On pourrait également ajouter des parois pour éviter que les hyphes ne soient repoussées face aux microcanaux.

D'autre part, parmi les filaments atteignant la chambre de flexion, seule une faible proportion est en réalité prise en compte pour les calculs de rigidité. En effet, il faut tout d'abord écarter les cas de filaments qui longent la paroi, c'est-à-dire qui ne poursuivent pas une croissance rectiligne à la sortie des microcanaux, mais qui se courbent pour suivre la paroi. Car, même si l'on tient compte de l'angle global de l'hyphe avec la paroi θ, celui-ci doit rester dans une gamme proche de la perpendiculaire au flux (plus ou moins entre 45° et 135°). Et il faut aussi éliminer les hyphes qui adhèrent à la surface.

Nous nous sommes également penchés sur la question des filaments qui ne sont pas entièrement dans le même plan, c'est-à-dire qui ne reposent pas sur le substrat en verre de la chambre. Ceux-ci ne peuvent pas être considérés en utilisant les calculs présentés précédemment puisque la force est déterminée en supposant les filaments "au sol". Mais en connaissant la position du filament, non seulement dans le plan xy mais également en z, il est possible de déterminer la force qu'il subit sous l'action du flux. Cela peut être réalisé à l'aide des simulations numériques de Comsol. Il faudrait cette fois considérer la force exercée sur un cylindre fini dans un liquide, qui s'écrit sous la forme suivante pour un cylindre de longueur l, de rayon r et un écoulement de vitesse v :

$$F = \frac{4\pi\eta}{log(\frac{l}{r}) - \frac{1}{2} + \log 2} vl \tag{3.9}$$

Enfin cette équation devrait être adaptée selon le profil de vitesse le long du cylindre, qui lui même dépend de sa position. Ces calculs, bien qu'envisageables, demandent une grande précision sur la localisation du filament en z et ainsi des observations supplémentaires, ce qui n'est pas non plus en faveur d'une amélioration du rendement de l'expérience.

Ce problème de rentabilité est d'autant plus important si l'on exclut les filaments présentant une part, même faible, de rotation. Cela représente l'autre problème essentiel de cette méthode : ces rotations engendrent de grandes incertitudes sur les valeurs finales obtenues.

3.5.3 Autres développements envisagés

Vers un modèle *in vivo*

Nous pouvons également remarquer que notre dispositif microfluidique s'approche dans son principe de la situation *in vivo* correspondant à l'étape d'invasion des vaisseaux sanguins par les hyphes, suivi de la dissémination de *C. albicans* dans la circulation (figure 3.29). Après avoir traversé les barrières épithéliales et endothéliales, les hyphes atteignent la circulation sanguine. De la même façon, dans nos expériences, elles atteignent une grande chambre où un flux peut être appliqué après avoir traversé les microcanaux. La mesure du module de flexion repose sur l'application de flux sur des durées très courtes. Mais ce système pourrait aussi être utilisé sous un flux continu, afin d'étudier le comportement d'hyphes dans un écoulement, comme celui de vaisseaux sanguins.

Transition inverse : hyphes vers levures

On peut notamment s'interroger sur la transition inverse d'hyphes vers levures. Le fait que la transition levures-hyphes est réversible est mentionné à plusieurs reprises dans la littérature et elle aurait lieu lorsque les hyphes atteignent la circulation sanguine afin de se disséminer plus facilement sous forme de levures. Plusieurs molécules entrainant la conversion d'hyphes en levures ont été identifiées [165] [166] [167], et pourrait donc être explorées en tant que traitement antifongique puisqu'elles empêcheraient la formation d'hyphes invasives. Au-delà de ces

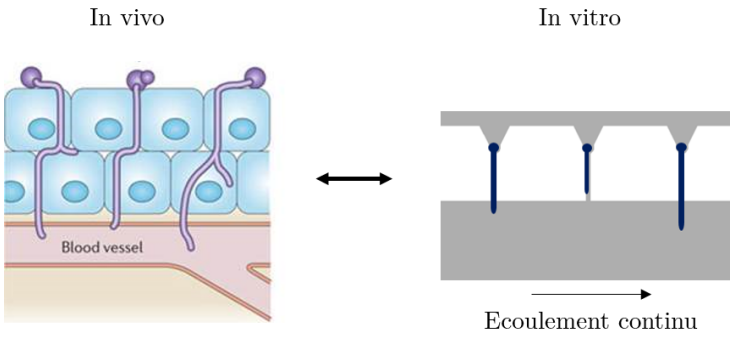


FIGURE 3.29 – Comparaison des situations *in vivo* et *in vitro*. Les hyphes passent à travers les tissus épithéliaux et endothéliaux avant d'arriver jusqu'à la circulation sanguine. Dans la puce microfluidique, les filaments croissent d'abord dans des microcanaux, c'est-à-dire un espace confiné comme les tissus cellulaires, et atteignent ensuite un canal dans lequel ils peuvent être soumis à un flux.

molécules spécifiques, il serait intéressant de comprendre comment et pourquoi se déclenche une telle transition.

Tout d'abord, une première question concernant la mécanique de cette transition se pose. En effet, certaines études montrent qu'il est possible de passer d'une culture d'hyphes à une culture contenant presque uniquement des levures [165] [166]. Mais cela signifie-t-il simplement que les hyphes vont "produire" des levures ou qu'elles vont elles-mêmes se transformer en levures ? Ces études semblent montrer une réduction de la quantité d'hyphes, et non seulement une augmentation de celle de levures. Mais en observant une portion de culture en milieu liquide, il est difficile de quantifier précisément ce phénomène et donc de distinguer entre ces deux situations. Des éléments semblent pourtant indiquer que des levures sont simplement produites latéralement sur des hyphes [168]. Ce phénomène semble d'ailleurs se produire dans des conditions qui induisent la filamentation car des branchements latéraux ainsi que des levures latérales peuvent croître en même temps.

La puce utilisée dans ce chapitre pourrait être un bon outil pour étudier cette transition. Elle permet en effet, suite à la croissance d'hyphes, de suivre leur évolution en les maintenant à position fixe grâce aux microcanaux. Et un flux peut être appliqué de façon à évacuer les levures environnantes, qui empêcheraient de distinguer les hyphes. On pourrait ainsi utiliser un flux avec de l'acide gymnémique, qui favorise à priori la conversion d'hyphes en levures [166].

Une autre question particulièrement importante dans le contexte médical de l'étude de *C. albicans* concerne la raison de cette transition : comment est-elle déclenchée ? Le changement d'environnement, tant physique (relâchement du confinement au niveau du tissu) et chimique (différente composition de milieu) est une possibilité. Mais le fait d'être soumis à une contrainte de cisaillement due à l'écoulement sanguin est également un facteur possible. On peut donc se demander comment se comportent des hyphes soumis à un flux continu, en maintenant une composition de milieu identique, et donc induisant la filamentation.

Caractérisation des hyphes et pseudo-hyphes

Les jonctions entre articles d'une hyphe sont beaucoup plus solides que celles entre des pseudo-hyphes. En effet, nous avons vu que ces dernières comportent une constriction et peuvent être séparées, par exemple sous l'effet d'ultrasons, contrairement aux vraies hyphes [14]. Cette séparation mécanique des cellules de pseudo-hyphes pourrait aussi s'effectuer par cisaillement sous un flux. Ainsi, la force nécessaire pour séparer les compartiments pourrait être un nouveau moyen de caractérisation et de distinction entre hyphes et pseudo-hyphes.

Mesure des forces d'adhésion

On peut aussi envisager d'utiliser ce système afin de mesurer les forces d'adhésion des hyphes. En effet, nous nous sommes rapidement rendus compte pour ces expériences de flexion que l'adhésion était un point essentiel. Ainsi dans certains cas, les hyphes restent immobiles à faible flux et se détachent soudainement du substrat lorsque le débit augmente. On peut alors en déduire la force nécessaire pour détacher l'hyphe de son substrat, c'est-à-dire la force d'adhésion. De plus, grâce au coating différencié entre les deux chambres principales, on pourrait étudier les forces d'adhésion des hyphes sur différents substrats et traitements de surface.

CHAPITRE 4

CROISSANCE SINUSOÏDALE/HÉLICOÏDALE DES HYPHES

Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte.

Louis Pasteur

4.1 Introduction

La compréhension du mécanisme d'invasion des hyphes passe en partie par la compréhension de la façon dont elles se dirigent dans leur micro-environnement. Dans le cadre d'études classiques sur ce type d'organismes, les cultures sont généralement réalisées en milieu liquide ou sur des surfaces homogènes. Cependant, les champignons doivent en réalité faire face à des environnements complexes, dont les propriétés peuvent varier spatialement, tant au niveau physique (topographie, densité, rigidité) que chimique (molécules de surface, gradients solubles, etc..). Une façon d'aborder la question de l'influence de l'environnement physique est d'étudier la croissance de ces organismes dans des environnements structurés, notamment à l'aide de techniques de microfabrication. Les interactions entre la pointe des hyphes et le milieu environnant sont déterminantes pour le comportement et la croissance des filaments.

4.1.1 Thigmotropisme et croissance sinusoïdale/hélicoïdale des hyphes

Nous allons commencer par analyser les réponses directionnelles d'hyphes de différentes espèces face à certains obstacles. Cette capacité à se réorienter suite à un stimulus physique, un contact, est appelée thigmotropisme. Nous verrons ici comment se manifeste le thigmotropisme et nous nous intéresserons en particulier à un mode de croissance sinusoïdal ou hélicoïdal parfois rencontré chez les hyphes.

Observations

Avant d'analyser les différents mécanismes pouvant être mis en jeu, nous allons commencer par rapporter ici quelques observations concernant l'effet du micro-environnement sur la trajectoire des hyphes.

Réorientation face à un obstacle Le thigmotropisme est un phénomène qui a été observé à plusieurs reprises chez des hyphes. Il peut être positif ou négatif selon que la croissance se fait vers le point de contact ou à l'opposé.

Pour étudier ce phénomène, une méthode simple consiste à placer des obstacles sur la trajectoire des hyphes. Plusieurs comportements intéressants ont ainsi été observés. Tout d'abord, l'apex de l'hyphe qui entre en contact avec un obstacle semble adopter une morphologie asymétrique [64] [169] [170]. Comme on peut le voir sur la figure 4.1, l'apex et ses composants s'orientent vers la surface de contact (morphologie parfois appelée "*nose-down*").

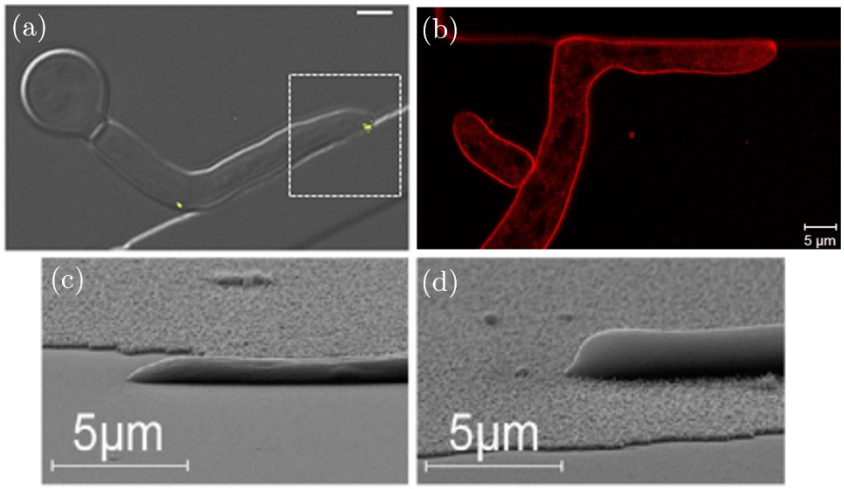


FIGURE 4.1 – Exemples de morphologie "*nose-down*" où l'on voit une asymétrie de l'apex orienté vers la surface de contact. (a) *C. albicans* [64] et (b) *N. crassa* [170] présentant un marquage fluorescent du Spitzenkörper : Mlc1-YFP (a) et FM4-64 (b). (c)(d) Images de cryo-microscopie électronique de *A. niger* [169].

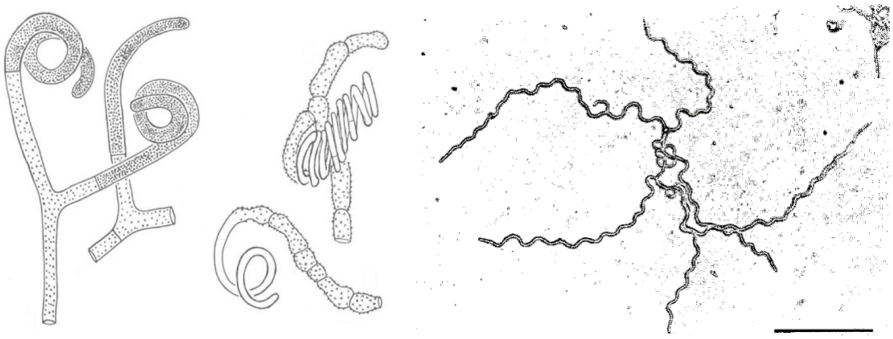
Cela induit une plus grande propension à suivre les contours des parois. De plus, *C. albicans* semble percevoir le contact mais également la rigidité du substrat, car l'apex s'oriente préférentiellement vers la surface la moins rigide lorsque placé entre deux surfaces différentes [64]. Cette étude montre également que le comportement des hyphes et leur façon de se réorienter face à un obstacle dépendent largement de la friction. Cette friction peut être générée en confinant l'hyphe entre deux parois de PDMS dans une puce microfluidique ou en utilisant un coating adhésif. Elle empêche alors le mouvement vers l'arrière de l'hyphe face à l'obstacle et la force à changer de direction de croissance.

L'utilisation de marches de hauteur inférieure au diamètre des hyphes permet d'étudier la réorientation des filaments face à un obstacle. Deux situations sont possibles : soit les hyphes "sentent" l'obstacle et se réorientent pour suivre la paroi, soit elles maintiennent leur direction

de croissance initiale. Ce type d'étude a été réalisé sur *C. albicans* [171] et *A. niger* [169].

Dans l'étude sur *A. niger*, l'angle de contact entre l'hyphe et la crête a un effet important sur la capacité du filament à se réorienter. Un angle de plus de 60° ne mène à presque aucune réponse thigmotropique : aucun changement de direction n'est observé. Il semble aussi que les hyphes ne réagissent pas de la même façon selon la quantité de nutriments disponibles. En effet, les réponses thigmotropiques accompagnées de cette morphologie "*nose-down*" augmentent lorsque les hyphes sont plus éloignées de la source de nutriments. Cela signifie que la sensibilité au contact serait plus grande en milieu pauvre.

Formation de sinusoïdes ou hélices Au-delà de la tendance à suivre les contours, d'autres trajectoires de croissance plus originales ont été observées. On distingue ainsi des cas de croissances sinusoidales ou hélicoïdales pour différentes espèces de champignons filamenteux. Cette croissance hélicoïdale (ou en spirale) a été reportée par exemple pour les espèces de *Trichophyton* en 1937 [172], ou de *Phycomyces* en 1979 [173]. La première observation de ces hélices chez *C. albicans* date de 1994 [174]. Des images de ces travaux sont représentées en figure 4.2.



(a) *T. gypseum* (adapté de [172])

(b) *C. albicans* [174]

FIGURE 4.2 – Croissance hélicoïdale sur de l'agar. La seconde image suggère plutôt une croissance sinusoïdale mais les auteurs ont montré que la trajectoire n'était pas contenue dans un seul plan focal [174]. Barre d'échelle : 100 µm.

Les conditions d'observations de ce comportement sont bien spécifiques et impliquent souvent la croissance sur un milieu solide ou semi-solide comme des gels. Pour *C. albicans*, les champignons sont cultivés sur un gel d'agar contenant un milieu inducteur de filamentation comme le sérum. La rigidité du substrat est un paramètre très important puisque pour des faibles concentrations d'agar (0,5 ou 1%), les filaments sont majoritairement droits, tandis que pour 2 ou 4%, une grande proportion présente cette morphologie sinusoïdale ou hélicoïdale [43] [174].

Tout comme pour le thigmotropisme, la faible quantité de nutriments semble favoriser la réponse des hyphes au contact sous forme de sinusoïdes. Ainsi l'ajout d'une source supplémentaire de carbone dans le milieu comme du glucose réduit la formation de sinusoïdes [43].

La température semble également avoir un effet : à 25°C aucune hélice ne se forme contrairement à 37°C. De façon intéressante, il est possible d'induire une transition entre une croissance hélicoïdale et une croissance rectiligne pour une même hyphe, comme on le voit sur la figure

4.3. Cela peut se faire par un changement de température, ou un changement de contraintes physiques.

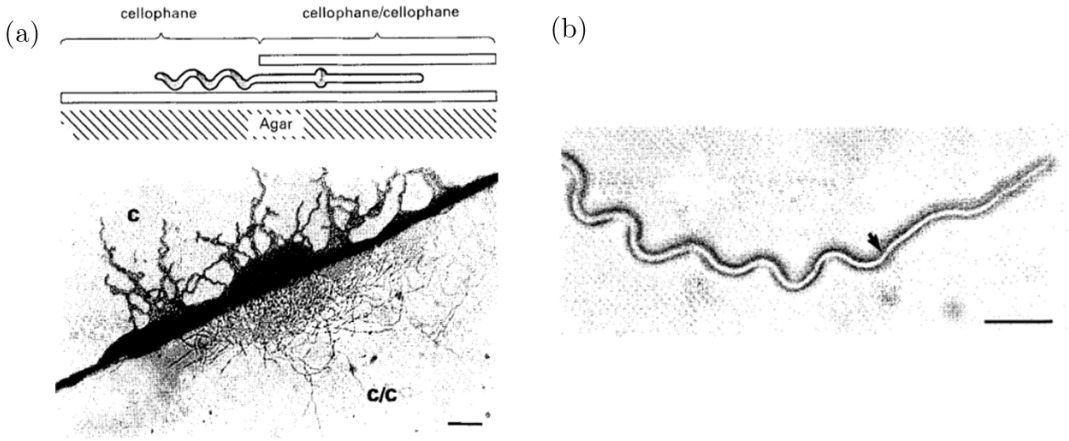


FIGURE 4.3 – Transition entre une croissance rectiligne et une croissance hélicoidale [174] (a) par un changement de contraintes mécaniques, (b) par l'augmentation de la température de 25°C à 37°C, indiquée par la flèche. Barre d'échelle : 20 µm.

Morphologie des sinusoïdes ou hélices Il est important de souligner que parfois, les termes d'hélices et de sinusoïdes sont tous deux employés dans la littérature pour décrire ce type de croissance sur gel d'agar. Il est en effet assez difficile de quantifier précisément si ces oscillations se font dans un plan ou en 3D.

Toutefois des images de microscopie confocale ou des changements de focus en microscopie classique ont permis dans certains cas de détecter une structure 3D de ces hyphes. Ces hélices ont même été déterminées comme étant des hélices droites [174].

La description des sinusoïdes passe notamment par la mesure des longueurs d'onde et amplitudes. Ces paramètres semblent relativement bien conservés le long d'un même filament, et au sein d'une même population, mais ils pourraient différer d'une souche à l'autre. Il a par ailleurs été montré que les conditions environnementales comme la concentration d'agar affectent uniquement la capacité des hyphes à former des sinusoïdes, et non pas la forme de celles-ci [43].

Les auteurs de cette étude précisent également qu'une longueur d'onde correspondrait généralement à la taille d'un article, ce qui les amène à penser que ces oscillations seraient corrélées au cycle cellulaire.

Il est également intéressant de noter que ces sinusoïdes ou hélices forment nettement moins de branchements que les hyphes ayant une trajectoire rectiligne, comme on le voit sur la figure 4.2b [174].

Rôle du Spitzenkörper/polarisome

Nous allons maintenant essayer de distinguer certains mécanismes qui pourraient expliquer ces réponses particulières des hyphes à l'interaction avec l'environnement. Dans le chapitre 1, le processus de croissance polarisée a été détaillé. L'un des éléments essentiels est la présence de

complexes de polarité à l'apex comme le Spitzenkörper ou le polarisome. Plusieurs travaux se sont ainsi naturellement intéressés au rôle de ces derniers dans le thigmotropisme et la formation des sinusoïdes.

Dans un premier temps, l'asymétrie de l'apex de l'hyphe mentionnée plus haut est liée au positionnement asymétrique du Spitzenkörper chez *C. albicans* [64] tout comme chez *N. crassa* [170]. Lorsqu'il rencontre un obstacle, le Spitzenkörper se déplace à chaque fois vers le point de contact, ce qui le mène à suivre les surfaces. Chez *C. albicans*, la délétion de Rsr1, une protéine responsable du positionnement des complexes de polarité, entraîne une diminution de la sensibilité au contact [175]. Ce mutant ne possède plus d'asymétrie à l'apex et peut alors passer au dessus de petits obstacles. Le schéma 4.4 montre le lien potentiel entre la morphologie de l'apex et la réponse de l'hyphe à la topographie. Selon la position de l'apex et du Spitzenkörper, elle va se réorienter ou non face à une crête et elle va suivre ou non la surface avec laquelle elle est en contact.

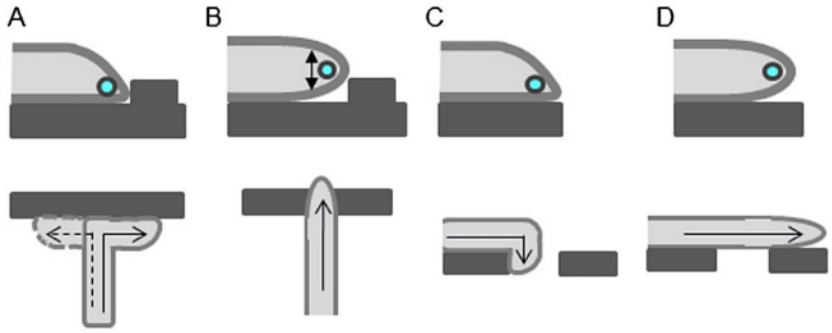
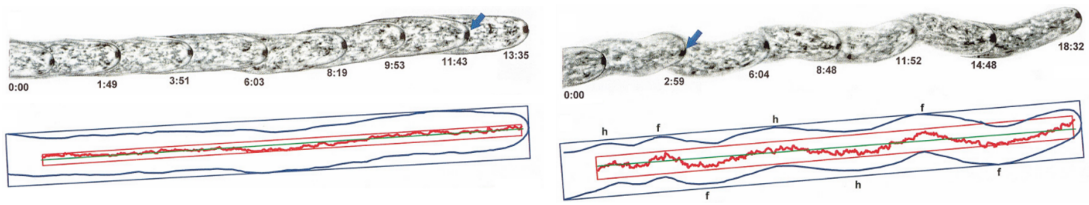


FIGURE 4.4 – Modèle suggéré pour expliquer le rôle de la morphologie à l'apex sur les réponses directionnelles des hyphes [64]. Une morphologie asymétrique à l'apex dirige la croissance vers le substrat : l'hyphe sentirait donc un muret face à elle et suivrait son contour (situation A) et de même, l'hyphe aurait tendance à suivre sa surface de contact même avec un angle important (situation C). Au contraire, sans localisation spécifique du Spitzenkörper près de la paroi, l'hyphe poursuivrait une croissance rectiligne lui permettant de passer au dessus de l'obstacle (B) et de ne pas tenir compte des discontinuités de surface (D).

Concernant la formation de sinusoïdes ou d'hélices, le Spitzenkörper a également été étudié chez *N. crassa* dans le contexte de la formation de sinusoïdes ou d'hélices [170] [38]. Dans ces champignons, il est facilement repérable car il se présente sous la forme d'un point noir en microscopie à contraste de phase, ce qui n'est pas le cas chez *C. albicans*. L'objectif de cette étude était de corréler les mouvements du Spitzenkörper avec la trajectoire de l'hyphe, et d'utiliser le modèle de centre d'approvisionnement de vésicules (VSC) afin d'expliquer cette corrélation. On peut constater que la croissance de *N. crassa* peut aussi se produire de façon sinusoïdale sur une surface d'agar (figure 4.5b). Cette figure montre la forme de l'hyphe ainsi que la position du Spitzenkörper. Il présente un mouvement globalement vers l'avant mais également de petites oscillations transverses fréquentes. Ces oscillations apparaissent même dans le cas d'hyphes dont la trajectoire est droite (figure 4.5a), mais ont une plus grande amplitude lorsque l'hyphe a une trajectoire sinusoïdale (figure 4.5b). Il est souligné ici que le déplacement du Spitzenkörper

précède le changement de direction de croissance.



(a) Une hyphe ayant une croissance rectiligne (b) Une hyphe ayant une croissance sinusoïdale

FIGURE 4.5 – Suivi de la trajectoire du Spitzenkörper chez *N. crassa* [38]. On observe de petites oscillations transverses du Spitzenkörper pour l'hyphe droit, et de plus grande amplitude pour l'hyphe à croissance sinusoïdale.

Le rôle de protéines intervenant dans l'établissement de la polarité est également examiné chez *A. nidulans* [176]. Ainsi des protéines qui serviraient à l'initiation de la polarisation des hyphes ont été identifiées. TeaA, une protéine intégrée dans un complexe localisé à l'apex, contenant également des promoteurs de polymérisation de l'actine comme la formine, serait transportée le long des microtubules par la kinésine KipA, et s'accrocherait à la membrane grâce à la protéine TeaR. Le complexe ainsi formé permettrait ensuite la croissance de filaments d'actine à l'apex. Alors que la souche sauvage croît normalement en ligne droite, les mutants portants ces délétions adoptent une trajectoire avec des oscillations. Celles-ci sont plus ou moins régulières et avec des amplitudes variables comme on peut le voir sur la figure 4.6.

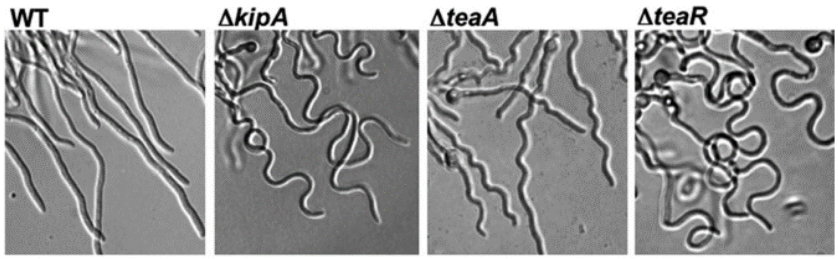


FIGURE 4.6 – Morphologie de croissance de la souche sauvage (WT) de *A. nidulans* qui forme des filaments droits, et de plusieurs mutants possédant des délétions de gènes impliqués dans la polarisation ayant une croissance sinusoïdale [176].

Dans cette étude, l'utilisation de marqueurs fluorescents a permis de localiser le Spitzenkörper. L'observation de la croissance sinusoïdale semble ici aussi liée aux mouvements latéraux du Spitzenkörper. La dynamique du Spitzenkörper n'a pas été suivie dans cette étude mais les images montrent qu'il ne maintient pas sa position habituelle au centre de l'apex.

D'autres mutations de différents champignons filamenteux ont également mené à l'observation de croissance hélicoidale. Ces mutants perturbent généralement le transport d'organites à l'apex et la taille ou la position du Spitzenkörper [177] [178].

Rôle du calcium

L'effet de la régulation de la concentration de calcium sur l'orientation de la filamentation a été étudié [43] [179]. La protéine Cch1 est particulièrement impliquée dans le galvanotropisme, c'est à dire la réponse directionnelle à un champ électrique. Ces travaux ont en effet montré que les hyphes s'orientent vers la cathode lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique.

Des mutants de délétion des canaux calciques ont également été testés pour leur comportement thigmotropique. La proportion d'hyphes qui se réorientent au contact avec une marche de 0.8 µm de hauteur passe d'environ 60% pour la souche sauvage à seulement 30 ou 40 % pour ces mutants. L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène est schématisée sur la figure 4.7. Dans un premier temps, la rencontre avec un obstacle entraînerait un stress mécanique localisé dans la membrane. Celui-ci serait ressenti par les canaux ioniques méchanosensibles Mid1. L'ouverture de ces canaux augmenterait localement la concentration de calcium et ainsi favoriserait l'expansion de la membrane et de la paroi à cet endroit.

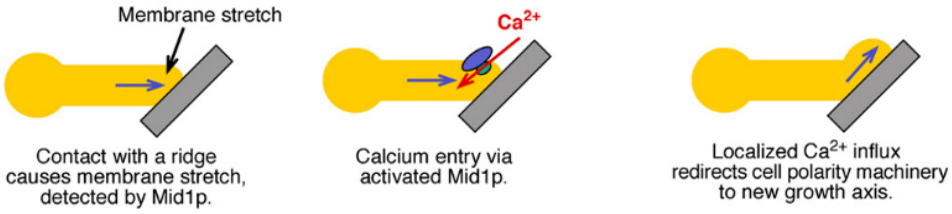


FIGURE 4.7 – Proposition de modèle expliquant le rôle du calcium dans les réponses thigmotropiques [179]. Un contact avec une structure entrainerait l'activation des canaux calciques et par conséquent un apport de Ca^{2+} localisé, qui se traduirait par une réorientation de la croissance de l'hyphe.

Les mêmes auteurs ont poursuivi ce travail en étudiant l'effet du calcium sur la formation de sinusoïdes, qui est un autre exemple de la réponse des hyphes au contact d'un obstacle, ici d'un gel d'agar [43]. Les mutants délétés de canaux calciques ont également une plus faible propension à croître sous forme de sinusoïdes ou hélices. De la même façon, la chélation du calcium dans le milieu ou l'ajout de bloqueurs de canaux ioniques ont aussi pour effet la réduction de la formation de sinusoïdes. Un autre mutant a aussi été construit : la délétion de l'ATPase Pmr1 entraîne une accumulation anormale de Ca^{2+} dans la cellule [180]. Ce mutant quant à lui ne forme pas du tout de sinusoïdes. Ces différentes expériences semblent mener à la conclusion que le gradient de la concentration interne de calcium est largement impliquée à la fois dans la sensibilité aux contacts et dans la formation de sinusoïdes.

Rôle de la paroi

Une observation intéressante a été faite concernant le mutant Δ*pmr1* que nous venons de mentionner : en plus de son impact sur la régulation du calcium, cette souche présente également des changements de composition de paroi importants. En effet, ce mutant présente un défaut de glycosylation entraînant une réduction de 80% de la quantité de mannanes dans la couche externe, qui est compensée par une augmentation de la proportion de glucanes [181]. Pour tester

si la disparition du phénotype sinusoïdal chez ce mutant peut être liée à la composition de la paroi, d'autres mutants et traitements affectant la synthèse ou les liaisons entre les polymères ont été réalisés. Il en résulte que la formation de sinusoïdes semble légèrement affectée par l'altération de la composition en chitine ou en β-glucanes, mais plus fortement par l'altération de la mannosylation [43].

La paroi serait donc, à l'instar de la membrane cytoplasmique dans les cellules animales, un élément essentiel dans la capacité des hyphes à répondre aux stimuli externes. Une hypothèse similaire a été émise dans le cas d'*A. niger* [169]. Les auteurs ont constaté qu'en s'éloignant des nutriments, les hyphes deviennent plus sensibles à la topographie et elles changent également de morphologie. Étant donné qu'une des réponses au stress est d'augmenter la quantité de chitine dans la paroi [182], il est possible que, face à un manque de nutriments, le même type de réponse soit déclenché. Cela induirait alors des changements au niveau de la paroi, qui pourrait expliquer la morphologie différente et pourrait être corrélé à l'amplification de la sensibilité à la topographie.

En effet, nous avons déjà mentionné le fait que le milieu de croissance influençait la composition de la paroi. Du lactate en tant que source de carbone donne par exemple lieu à une paroi moins épaisse qu'avec du glucose, et entraînerait aussi une augmentation de la sensibilité au contact [183].

Il a également été suggéré que les hyphes présentant une croissance hélicoïdale seraient moins sensibles au traitement avec des échinocandines (antifongiques qui inhibent la synthèse de β-glucanes) que les hyphes ayant une croissance rectiligne [174].

Croissance sinusoïdale/hélicoïdale et virulence

La question du rôle de ces modes de croissance n'a pas encore été élucidée, en particulier à cause du manque de preuve de la présence de sinusoïdes ou d'hélices lors d'infections *in vivo*. Une croissance de ce type a tout de même été observée pour divers champignons pénétrant dans des lentilles de contact [184], qui peuvent être assimilées à des gels, ce qui est donc cohérent avec les observations précédentes. Une autre étude montre des hyphes de *C. albicans* qui adoptent une structure hélicoïdale lors de leur pénétration dans des ongles (onychomycose) [185]. Une croissance en forme d'hélices pourrait faciliter la pénétration des tissus épithéliaux, elle pourrait permettre une plus grande exploration de l'environnement et pourrait localiser des failles, ou des zones plus facilement pénétrables par exemple. Il est également important de noter que certains des mutants mentionnés ici (Δ*pmr1* ou Δ*rsr1* par exemple) qui réduisent la capacité des hyphes à sentir les surfaces ou à former des sinusoïdes voient leur virulence sévèrement atténuée [175] [181].

4.1.2 Autres réponses des hyphes à un contact

L'interaction avec l'environnement extérieur ne se limite pas uniquement à des changements de directions de croissance, mais peut aussi être responsable de changements de morphologie ou d'autres phénomènes plus surprenants comme la mémoire directionnelle.

Changement de morphologie

Parmi les changements de morphologie, on peut par exemple citer un phénomène associé aux champignons pathogènes des plantes. Ceux-ci sont en effet capables de former des structures bien particulières, appelées appressoria, capables de pénétrer dans les cellules de la plante. La figure 4.8 illustre ce processus. Les spores commencent par adhérer à la surface et former des tubes germinatifs. En cas de contact avec une surface appropriée, ils vont cesser de croître et produire un appressorium. Celui-ci génère une très grande pression de turgescence, lui permettant d'exercer une force suffisante pour pénétrer dans la plante. Il a été montré que la formation de ces appressoria peut être induite *in vitro* par des surfaces contenant des micro-structures, comme on le voit sur la figure 4.8b [186]. Cela confirme l'importance du contact dans ce changement morphologique.

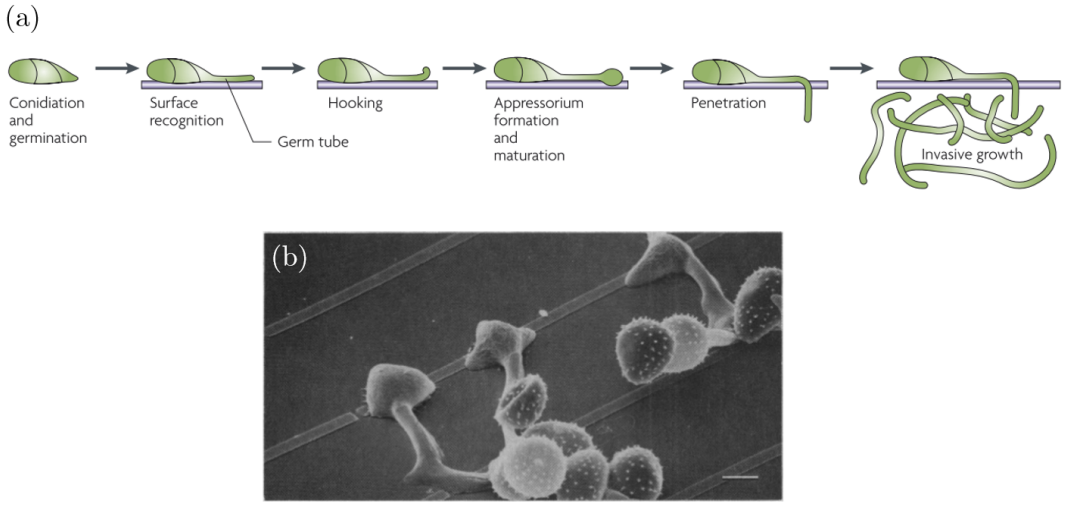


FIGURE 4.8 – Formation d'un appressorium par *Uromyces appendiculatus*. (a) Représentation schématique [187]. (b) Induction de la formation d'appressoria à l'aide de microstructures [186].

Le microenvironnement semble aussi avoir un effet sur le branchement des hyphes. Par exemple, le champignon *N. crassa* semble générer beaucoup plus de branches lorsqu'il progresse dans un canal large et est donc non confiné, que dans un canal à plus petites dimensions [188]. La position et la fréquence de branchement ont également été analysées dans des puces microfluidiques avec des structures de type labyrinthes [170] [189]. De façon similaire, les hyphes ne forment pas de branches lorsqu'elles sont confinées. Mais dès que le confinement est relâché ou si des ouvertures latérales sont présentes, de nouvelles branches se forment alors dans ces espaces disponibles. Il faut toutefois noter que ces observations ne concernent pas *C. albicans* dont le mode de branchement semble différent de celui de *N. crassa* notamment car ce dernier peut effectuer des branchements apicaux, contrairement à *C. albicans*.

Mémoire directionnelle

Un comportement intéressant a également été remarqué sur plusieurs types d'hyphes : la présence d'une mémoire directionnelle [64] [170]. Il s'agit du fait que le filament conserverait

sa direction initiale de croissance, même après avoir rencontré un obstacle qui l'aurait dévié de sa trajectoire. Ce phénomène est représenté sur la figure 4.9 pour *C. albicans* et *N. crassa*. La direction initiale de croissance semble persister sur de longues distances et aussi après plusieurs collisions. L'hypothèse avancée par les auteurs repose sur le Spitzenkörper qui agirait comme un gyroscope en se positionnant de façon à garder en mémoire la direction initiale.

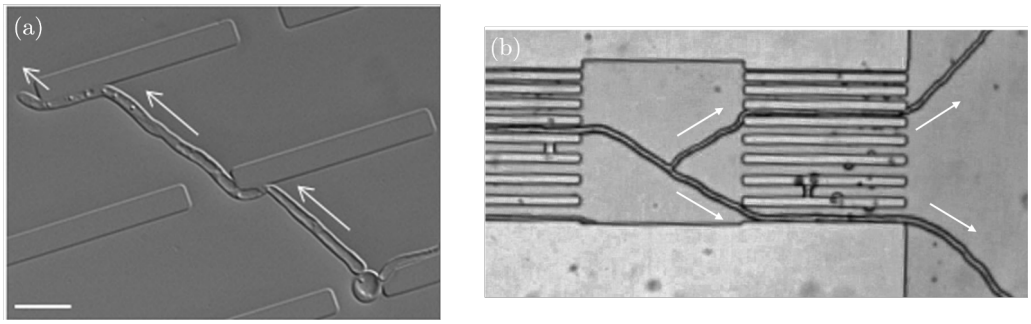


FIGURE 4.9 – Exemples représentant le phénomène de mémoire directionnelle où l'on voit le maintien de la direction de croissance initiale après contact avec un obstacle (a) chez *C. albicans* [64], (b) chez *N. crassa* [170].

La combinaison de cette mémoire directionnelle et de l'induction de branchements par les obstacles discutée précédemment permettrait une meilleure efficacité d'exploration de l'espace. Ces modes d'exploration ont été mis à l'épreuve dans des labyrinthes de dimensions micrométriques [189]. Il a ainsi été montré que ces caractéristiques des hyphes leur permettent de trouver aisément la sortie d'un labyrinthe.

4.1.3 Autres organismes

Le paragraphe précédent montre que, même s'il existe un ensemble d'observations à ce sujet dans la littérature, le phénomène de croissance sinusoïdale ou hélicoïdale n'a pas été systématiquement étudié chez les champignons. Cependant, on peut trouver des similitudes chez d'autres organismes.

Racines de plantes

On peut en effet trouver de nombreux exemples d'hélicité chez les plantes. Le terme de circumnutation a été introduit par Darwin pour décrire les mouvements circulaires observés chez les plantes, essentiellement pour les tiges ou les racines qui sont en croissance. Ce mouvement circulaire résulterait d'une croissance différentielle, c'est-à-dire que les vitesses de croissance ne seraient pas les mêmes entre les deux faces de l'organe en croissance. Combiné à la croissance verticale de l'organe en question, cela peut produire une trajectoire hélicoïdale.

La compréhension de ce phénomène reste encore assez limitée, mais différentes études tendent à soutenir l'hypothèse selon laquelle il pourrait être induit par le gravitropisme [1] ou par un mécanisme interne de la plante, ne dépendant pas des stimuli extérieurs.

1. comportement consistant à s'orienter avec la gravité.

Plusieurs travaux sur les racines de plantes montrent la présence d'oscillations lorsqu'elles se développent sur un gel d'agar rigide incliné, comme on peut le voir sur le figure 4.10. Une première hypothèse pour expliquer ce phénotype repose sur une combinaison de circumnutation, c'est-à-dire la tendance à former des hélices, de gravitropisme et de thigmotropisme [190]. On observe aussi souvent la présence d'une torsion qui pourrait résulter de l'aplatissement d'une hélice 3D sur la couche d'agar. Une autre proposition se concentre principalement sur le thigmotropisme et l'interaction physique entre la racine et son environnement [191]. De plus, des paramètres comme le gel utilisé ou la concentration en ions ont un effet sur la morphologie des racines, comme illustré sur la figure 4.10c [192]. La contribution des canaux ioniques a également été démontré, en particulier ceux responsables de la concentration de calcium. Plusieurs revues fournissent plus en détail les mécanismes qui pourraient expliquer ce mode de croissance [193] [194].

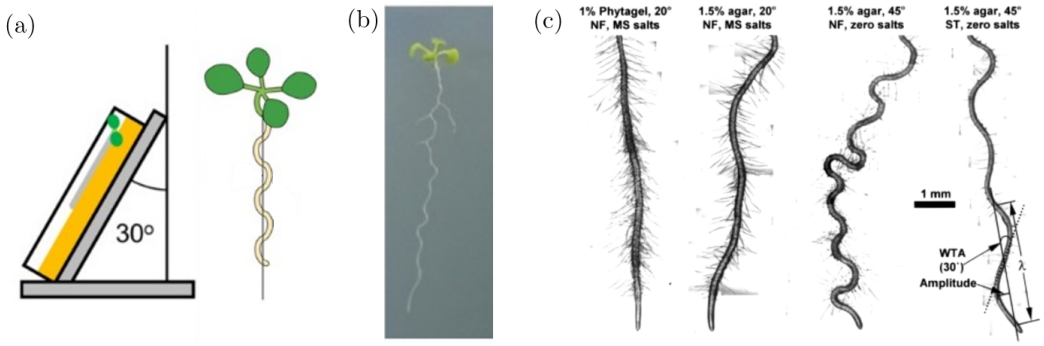


FIGURE 4.10 – Croissance sinusoïdale des racines de plante *Arabidopsis* [195]. (a) Système expérimental : les racines sont cultivées sur une couche d'agar qui est inclinée par rapport à la vertical. (b) Exemple de morphologie obtenue. (c) Changements de morphologie liés à l'inclinaison, le gel ou la composition du milieu.

C. elegans

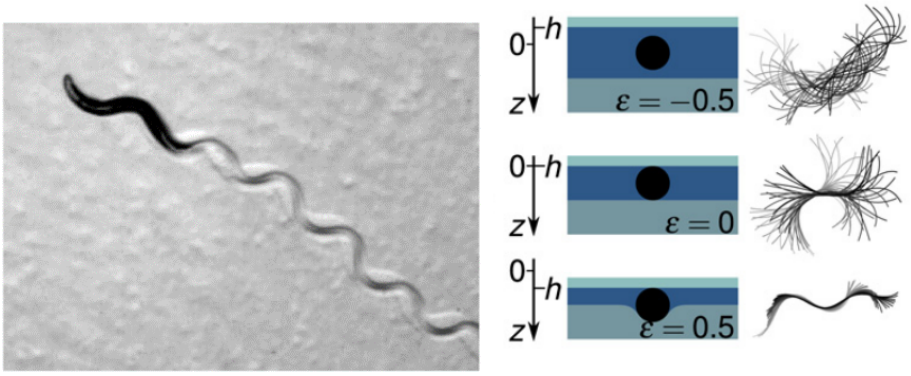
Caenorhabditis elegans est un nématode, ou ver rond, d'environ 1 millimètre de long. Il est considéré comme un organisme modèle en biologie car il est transparent et possède un nombre de cellules relativement faible et parfaitement cartographiées.

Contrairement aux hyphes qui progressent en augmentant leur taille, *C. elegans* se déplace dans son ensemble. Sur un gel, son mode de déplacement, appelé reptation, se traduit par une trajectoire sinusoïdale comme l'illustre la figure 4.11a.

Ainsi des paramètres caractérisant cette locomotion peuvent être extraits, comme la longueur d'onde et l'amplitude. Ces deux paramètres diminuent lorsque la rigidité de la gélatine sur laquelle avance le ver augmente [196].

Des expériences de confinement de *C. elegans* entre un gel d'agar et une lamelle de verre mobile ont été réalisées (figure 4.11b) [197]. Ce confinement induit un changement de comportement du ver avec une transition continue entre les modes de locomotion de nage et de reptation. De façon intéressante, l'adaptation à un changement brutal de confinement se produit instantanément. Ces expériences semblent aussi montrer que la courbure maximale du ver est une

constante quel que soit le confinement.



(a) Reptation sur un gel d'agar laissant une trace sinusoïdale [198]

(b) Confinement entre agar et lame de verre entraînant un changement de comportement [197]

FIGURE 4.11 – Croissance de *C. elegans* sur un gel d'agar.

Discussion sur les trajectoires sinusoidales

Ainsi, de façon assez surprenante, plusieurs types très différents d'organismes présentent un mode de déplacement sinusoïdal, que cela concerne l'organisme entier ou le déplacement de son apex. Dans le cas de *C. elegans*, ce mouvement sinusoïdal proviendrait d'une différence de contractilité musculaire entre les côtés du ver [199]. Dans le cas des plantes, une croissance asymétrique serait à l'origine des trajectoires non-rectilignes observées. La transposition de ces mécanismes aux hyphes ne peut en aucun cas être immédiate. Mais l'oscillation observée du Spitzenkörper, et la délivrance alternée des vésicules d'un côté et de l'autre de l'hyphe qui devrait en résulter, pourrait suggérer un mécanisme de croissance asymétrique. Cette question sera abordée plus loin dans les résultats.

4.2 Caractérisation des sinusoïdes de *C. albicans*

L'analyse d'images effectuée pour obtenir les coordonnées des trajectoires sinusoïdales est détaillée en annexe D pour les différentes situations présentées dans ce chapitre. Elle a été réalisée à l'aide de Fiji et Matlab. Les principaux problèmes rencontrés pour automatiser au maximum cette analyse y sont discutés et incluent en particulier la superposition des filaments et le fait qu'il est nécessaire de "redresser" leur trajectoire globale.

Lorsqu'une image comme celle de la figure 4.12 est obtenue, on peut caractériser la forme de la trajectoire. Les maxima et minima locaux sont repérés de façon à calculer les amplitudes et longueurs d'onde.

On obtient alors une trajectoire sinusoïdale de la forme :

$$y(x) = \frac{a}{2}\sin(\frac{2\pi x}{\lambda}) \tag{4.1}$$

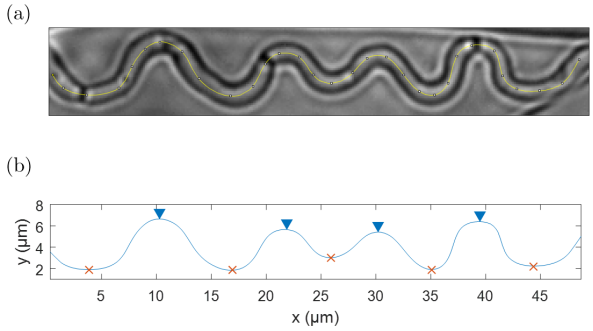


FIGURE 4.12 – Exemple illustrant la caractérisation des sinusoïdes. (a) Image d'hyphe sur laquelle la trajectoire, c'est-à-dire le squelette, est dessinée. (b) À partir des coordonnées de ce squelette, les maxima et minima de la sinusoïde sont repérés et les longueurs d'onde et amplitudes sont alors calculées.

avec a l'amplitude pic-à-pic et λ la longueur d'onde. On peut également calculer la courbure maximale au niveau des pics qui s'exprime :

$$C_{max} = y''(x) = \frac{2\pi^2 a}{\lambda^2} \tag{4.2}$$

4.3 Observations de croissance sinusoïdale ou hélicoïdale

Nous allons commencer par décrire plusieurs conditions pour lesquelles une croissance de type sinusoïdale ou hélicoïdale est observée.

4.3.1 Sur un substrat adhésif

Dans un premier temps, nous avons pu observer la formation de trajectoires sinusoïdales en milieu liquide sur un substrat particulièrement adhésif. Les levures sont alors simplement déposées en milieu liquide inducteur de filamentation sur des boites de Pétri pour culture cellulaire, comme schématisé sur la figure 4.13a. Alors que les hyphes croissent de façon plus ou moins rectilignes sur un substrat en verre par exemple, comme le montre l'image 4.13b, elles adoptent une trajectoire sinusoïdale sur ces boîtes de Pétri particulièrement adhérentes (figure 4.13c).

En constatant cette différence de comportement, on peut se demander si les hyphes sont capables de s'adapter à un changement de substrat au cours de leur croissance. Pour cela, des hyphes en croissance sur du verre ont été prélevées et déposées sur une boîte de Pétri. De façon intéressante, on remarque qu'environ une heure après le changement de substrat, les filaments, initialement droits, se mettent à croître sous forme de sinusoïdes. Malheureusement, l'expérience inverse (plastique vers verre) s'avère nettement plus compliqué car l'adhésion des hyphes à ce plastique est très importante et elles ne peuvent donc pas vraiment être décollées sans les détériorer. Mais cela montre tout de même la capacité de *C. albicans* à "sentir" son environnement et à s'y adapter.

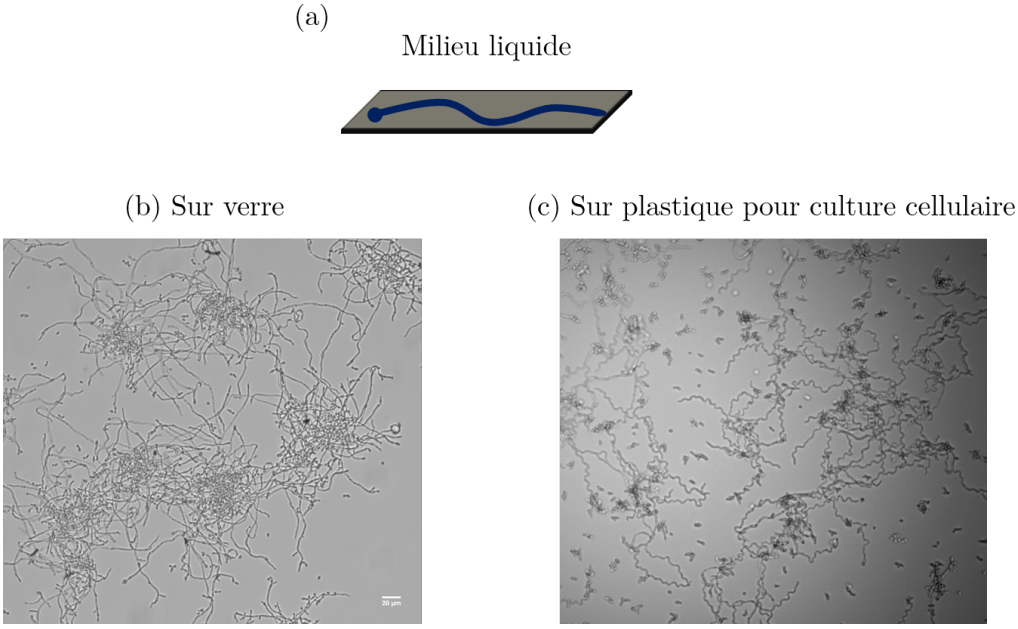


FIGURE 4.13 – Croissance d'hyphes en milieu liquide sur un substrat spécifique. (a) Représentation schématique de l'expérience. (b)(c) Images représentatives d'hyphes sur un substrat en verre (b) et sur du plastique pour culture cellulaire (c).

4.3.2 Confinement 3D dans un gel d'agar

Comme mentionné dans l'introduction de ce chapitre, les quelques exemples de croissance sinusoïdale ou hélicoïdale ont été observés dans la littérature dans des gels d'agar. Les conditions de culture spécifiques à l'agar sont décrites dans le chapitre 2. Globalement, les levures sont situées dans le gel et la présence d'un milieu inducteur de filamentation permet la croissance d'hyphes dans toutes les directions, atteignant ainsi également les interfaces supérieures (avec l'air) et inférieures (avec le substrat).

Observations

Dans un premier temps, nous avons observé la forme des hyphes à l'intérieur du gel d'agar grâce à un microscope confocal et à un marquage des parois au Calcofluor White. Un exemple dans un gel à 2% d'agar est illustré en figure 4.14. On y voit des hyphes n'ayant pas une trajectoire rectiligne, mais avec des oscillations. Plus précisément, on peut observer que celles-ci ne se font pas dans un même plan et on distingue ainsi des formes hélicoïdales.

Nous nous contenterons pour le moment de ces observations qualitatives, et n'analyserons pas plus précisément ces trajectoires en 3D qui semblent par ailleurs assez peu régulières.

Des trajectoires particulières peuvent également être observées à l'interface de l'agar avec l'air, comme indiqué sur le schéma 4.15a. Un marquage au Calcofluor White des hyphes couplé à un marquage avec du dextran du gel nous permet de visualiser un peu mieux cette interface. Une telle image de microscopie confocale est représentée en figure 4.15b. On y voit des trajectoires sinusoïdales, mais aussi à tendance circulaires.

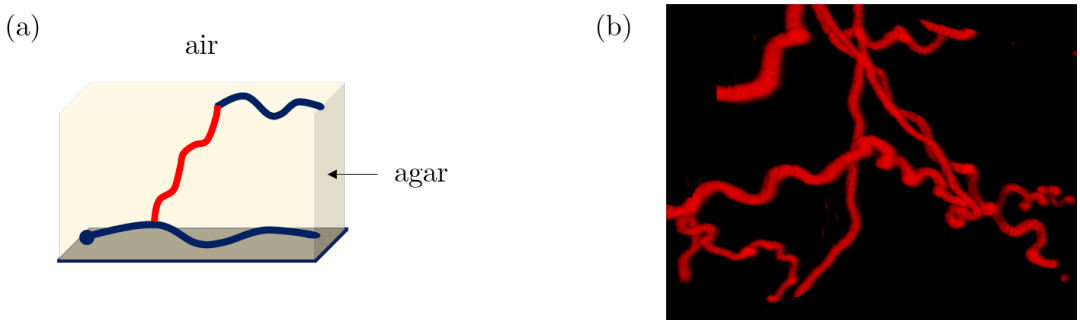


FIGURE 4.14 – Croissance des hyphes à l'intérieur du gel d'agar. (a) Représentation schématique de l'expérience avec la localisation des hyphes auxquelles on s'intéresse ici en rouge. (b) Image représentative des hyphes dans le gel par reconstruction 3D des images de microscopie confocale avec un marquage au Calcofluor White (ici représenté en rouge pour une meilleure visibilité).

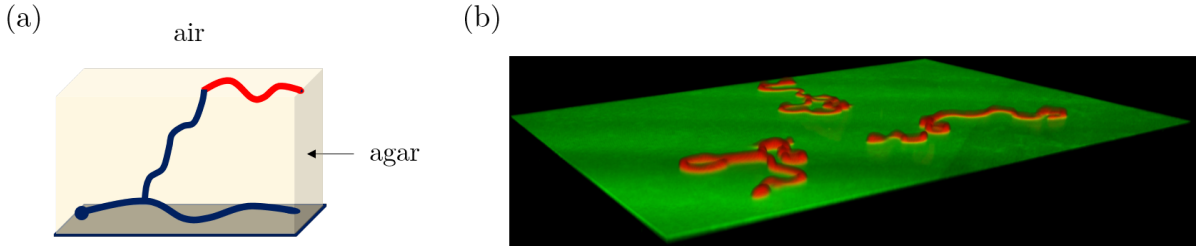


FIGURE 4.15 – Croissance des hyphes à l'interface entre le gel d'agar et l'air. (a) Représentation schématique de l'expérience avec la localisation des hyphes auxquelles on s'intéresse ici en rouge. (b) Image représentative des hyphes à cette interface par reconstruction 3D des images de microscopie confocale avec un marquage des hyphes au Calcofluor White (ici représenté en rouge), et de l'agar avec du dextran fluorescent (ici en vert).

On voit que les hyphes sont en partie ancrées dans l'agar. Ce dernier étant essentiellement constituée d'eau, il est possible qu'un fin film d'eau recouvre les filaments. Par capillarité, ce film d'eau pourrait alors exercer une pression sur les hyphes, ce qui les maintiendrait et les confinerait à l'interface. Au contraire, des expériences avec un ajout d'eau au dessus du gel ne permettent plus de distinguer de croissance sinusoïdale à cette interface. Cela est donc cohérent avec l'hypothèse d'un effet capillaire confinant les hyphes, responsable de ce mode de croissance.

Enfin, des sinusoïdes sont également présentes à l'interface inférieure, cette fois entre l'agar et le substrat. On notera cependant que même si ces trajectoires semblent être sinusoïdales, en champ clair et à faible grossissement, on ne peut exclure la possibilité d'une légère variation dans l'axe z.

Bien que les hyphes croissent dans des directions aléatoires, nous avons remarqué que lorsqu'elles atteignent l'interface substrat/agar, elles s'y maintiennent et ne retournent pas dans le gel. Elles préfèrent donc se glisser à l'interface entre la surface et le gel plutôt que de croître dans le gel.

Effet de la rigidité de l'agar

Nous allons maintenant analyser quantitativement les trajectoires sinusoïdales à cette interface.

Dans un premier temps, des expériences ont été réalisées avec différentes rigidités d'agar, variant de 0,2% à 5%, et à substrat fixé. On choisit ici d'utiliser une fine couche de PDMS étalée sur une lamelle de verre et ce PDMS est rendu hydrophile par traitement plasma. On voit sur les images représentatives de la figure 4.16 que les hyphes ont une croissance plutôt rectiligne pour de très faibles concentrations d'agar, c'est-à-dire de très faibles rigidités, tandis qu'on observe un comportement sinusoïdale pour les plus grandes concentrations.

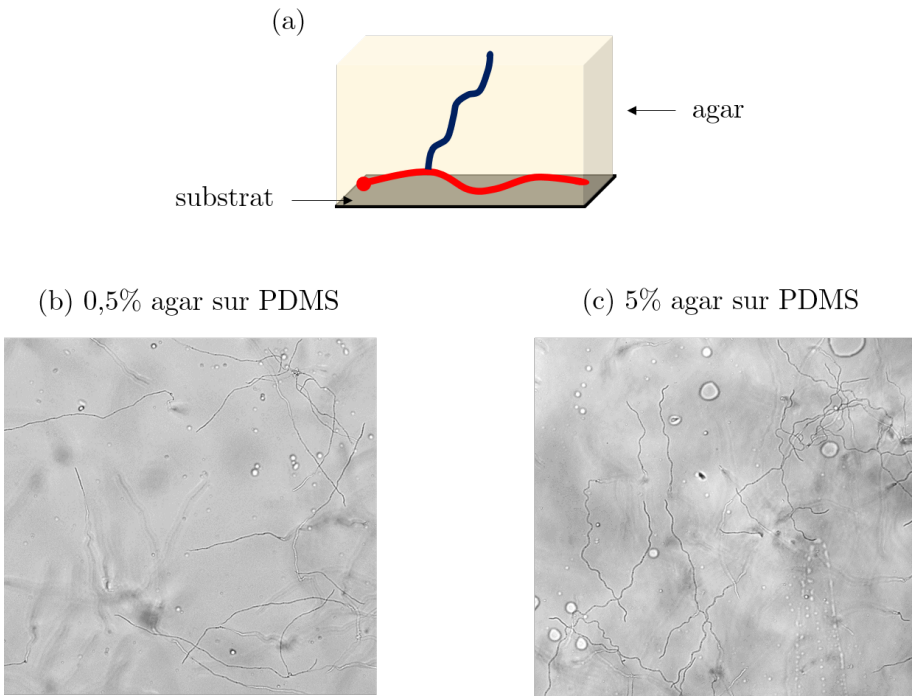


FIGURE 4.16 – Croissance des hyphes à l'interface entre le gel d'agar et le substrat, ici du PDMS ayant subi un traitement au plasma. (a) Représentation schématique de l'expérience avec la localisation des hyphes auxquelles on s'intéresse ici en rouge. (b)(c) Images représentatives des hyphes à cette interface pour un gel à 0,5% d'agar (b) et à 5% d'agar (c). Le comportement des hyphes dépend de cette concentration d'agar et tend vers une croissance sinusoïdale lorsque celle-ci augmente.

Le graphique en figure 4.17a montre effectivement que la proportion d'hyphes ayant un comportement qualifié de sinusoïdal augmente avec la concentration d'agar, de façon similaire à ce qui a été observé par ailleurs [43]. De plus, l'amplitude et la courbure de ces sinusoïdes augmentent elles aussi progressivement avec la concentration (figure 4.17b).

Ces résultats montrent que la concentration d'agar, par l'intermédiaire de la rigidité du gel, a un rôle important sur l'apparition et la forme de ces sinusoïdes.

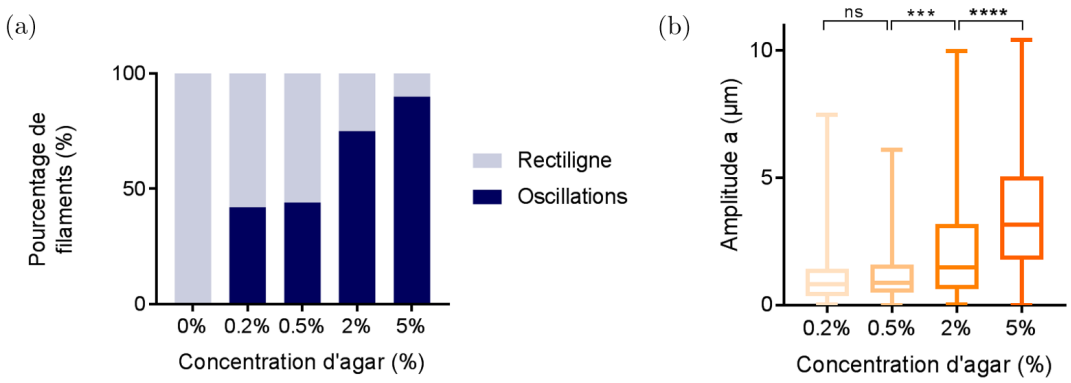


FIGURE 4.17 – Quantification de la croissance sinusoïdale à l'interface agar/PDMS hydrophile en fonction de la concentration d'agar. (a) Pourcentage de filaments ayant une croissance considérée comme rectiligne ou oscillatoire. (b) Amplitude des filaments avec des trajectoires considérées comme sinusoïdales (110<n<360). La propension des hyphes à adopter un comportement sinusoïdale avec de plus grandes amplitudes et courbures augmente avec la concentration d'agar. Les tests statistiques utilisés ici sont des tests non paramétriques Mann-Whitney.

Effet du substrat

Il est ensuite possible de modifier la nature du substrat. On peut commencer par regarder s'il existe une différence entre du PDMS hydrophile et du PDMS hydrophobe, c'est-à-dire sans aucun traitement plasma. En effectuant les mêmes mesures que précédemment, on constate sur la figure 4.18a que pour le PDMS hydrophobe, les hyphes adoptent une croissance sinusoïdale quelle que soit la concentration de l'agar.

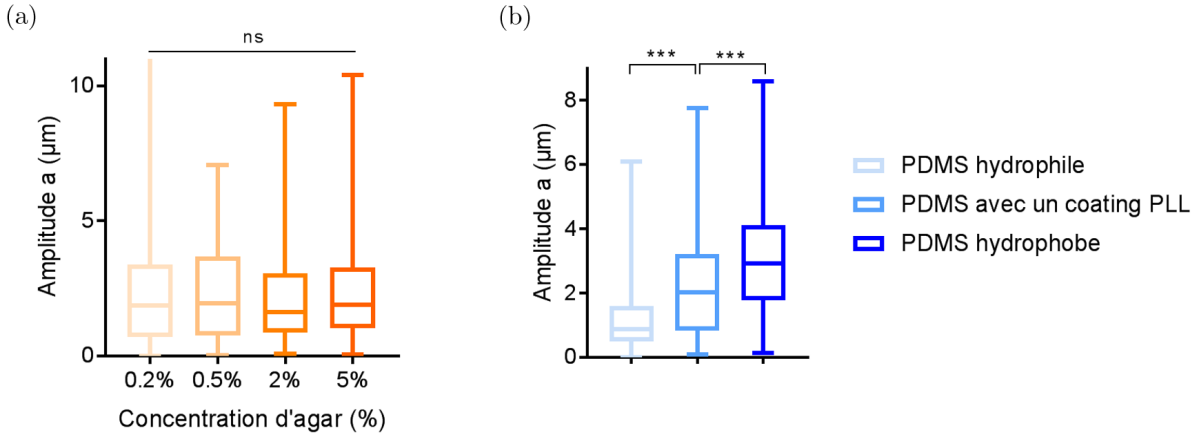


FIGURE 4.18 – Quantification de l'effet du substrat sur la croissance sinusoïdale. (a) Amplitude des filaments à l'interface agar/PDMS hydrophobe en fonction de la concentration d'agar (230<n<280). (b) Comparaison des amplitudes des hyphes à l'interface entre l'agar et différents substrats pour un même concentration d'agar égale à 0,5% (80<n<260).

Cela signifie que cette fois, la concentration d'agar n'a pas d'influence sur la formation de sinusoïdes. Dans ce cas, il semble donc que ce soit l'hydrophobicité du substrat qui la favorise. Cette observation est cohérente avec le fait que des sinusoïdes peuvent également apparaître sur un substrat adhésif comme décrit plus haut puisqu'à priori, les hyphes ont une meilleure affinité

avec un substrat hydrophobe. Afin de déterminer si l'affinité des filaments avec le substrat est un élément important dans la formation des sinusoïdes, nous avons également testé un substrat en PDMS avec un revêtement de PLL qui favorise l'adhésion. Pour une concentration d'agar fixée à 0,5%, on peut alors regarder l'évolution des paramètres des sinusoïdes en fonction du substrat sur lequel est déposé l'agar. La figure 4.18b montre que l'amplitude des oscillations est très faible pour un PDMS hydrophile, c'est-à-dire avec un comportement plutôt rectiligne, alors qu'elle augmente lorsqu'il est traité avec de la PLL et augmente à nouveau pour un PDMS hydrophobe.

4.4 Confinement axial dans une puce microfluidique

A partir de ces premières observations, il semble donc qu'il est possible de moduler non seulement l'apparition de sinusoïdes mais également les paramètres de ces trajectoires, à savoir amplitude et longueur d'onde. Cela peut se faire par l'intermédiaire de l'adhésion ou d'une forme de confinement telle qu'un gel d'agar. Nous allons à présent utiliser un dispositif microfluidique de façon à avoir un contrôle plus précis sur le confinement appliqué aux hyphes. Cela nous permettra également d'effectuer une analyse plus approfondie et systématique.

4.4.1 Observation de croissance sinusoïdale

Le design global des puces a déjà été discuté au chapitre 2 : une grande chambre d'ensemencement sert à positionner des levures en face de microcanaux de dimensions variables. Ici on souhaite étudier l'effet du confinement sur le comportement des hyphes. Ainsi des puces ont été fabriquées avec différentes hauteurs h égales à 1, 1,5 et 3 µm, confinant plus ou moins les filaments dont le diamètre est de l'ordre de 2 µm. La largeur des microcanaux varie entre 10 et 40 µm, de façon à vérifier que les parois latérales n'ont pas d'impact significatif sur l'apparition et la forme des sinusoïdes. La croissance hyphale est induite comme décrit au chapitre 2 grâce à la N-acétyl-D-glucosamine.

La plupart des souches présentées dans ce manuscrit ont été testées dans ces conditions et elles présentent toutes ce phénotype particulier de croissance sinusoïdale. Mais les analyses effectuées par la suite ont toutes été réalisées avec la souche de référence SC5314.

Il est important de noter ici que la croissance sinusoïdale n'apparaît pas dès le début de la filamentation. Dans le cas des canaux de hauteur inférieure au diamètre des hyphes, cela s'explique en réalité par le fait que les filaments ont plus de difficulté à pénétrer dans les canaux et on voit rarement des hyphes dans ces microcanaux pendant les premières heures. Au contraire, les hyphes parviennent à croître dans les canaux de 3 µm assez rapidement, mais leurs trajectoires semblent d'abord rectilignes. Ce n'est qu'après une dizaine d'heures de croissance qu'elles prennent une forme sinusoïdale.

Cela soulève une question fondamentale quant à l'apparition de ces oscillations : nécessite-t-elle un appauvrissement du milieu environnant ? N'ayant pas vraiment fait l'objet de notre étude, ce point sera abordé plus longuement dans la discussion.

4.4.2 Effet de la hauteur des canaux sur la forme des sinusoïdes

Globalement, on remarque qu'un filament conserve la même forme, c'est-à-dire les mêmes paramètres (amplitude et longueur d'onde) tout au long de sa croissance. On cherche à déterminer si la hauteur des microcanaux dans lesquels les hyphes croissent a un effet sur la forme de leurs trajectoires sinusoïdales. Des images représentatives illustrent la différence de trajectoires obtenues sur la figure 4.19b. Cette figure montre également les distributions d'amplitude a (c), de longueurs d'onde λ (d) et de courbures maximales C (e) pour chaque hauteur de canal.

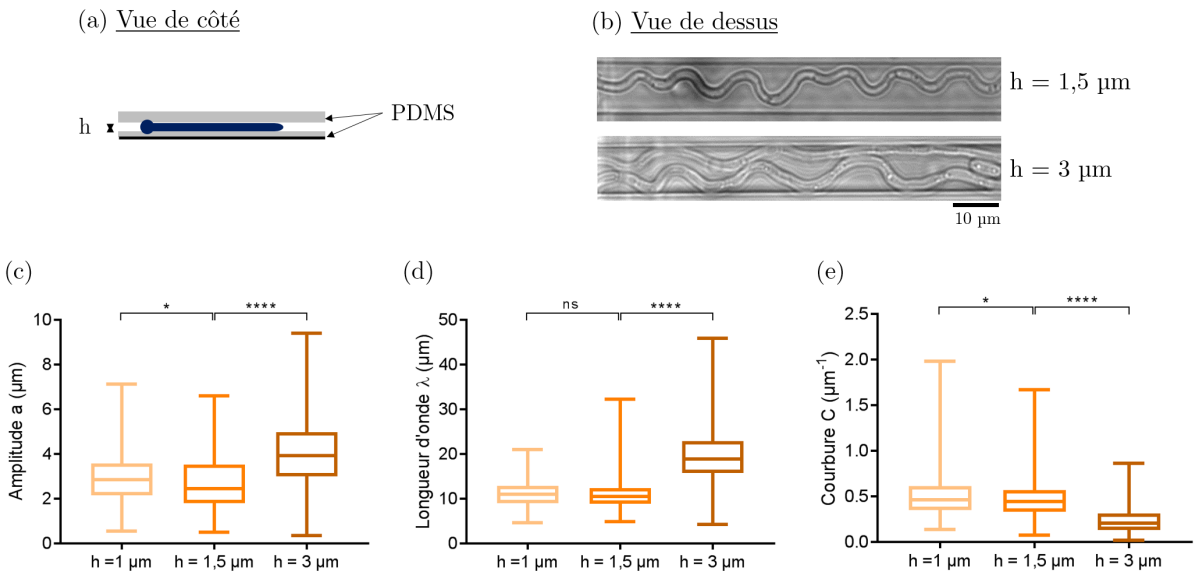


FIGURE 4.19 – Croissance des hyphes dans des microcanaux de hauteur h. (a) Représentation schématique en vue de côté. (b) Images représentatives de la croissance sinusoïdale obtenue dans ces conditions pour différentes hauteurs h. Comparaison des amplitudes a (c), longueurs d'onde λ (d) et courbures maximales C (e) pour ces différentes hauteurs de microcanaux (n=275 pour h=1 µm, n=447 pour h=1,5 µm et n=149 pour h=3 µm).

Il semble que le comportement des hyphes est très similaire dans les microcanaux de 1 et 1,5 µm, ce qui serait cohérent puisque les hyphes sont complètement confinées dans ces deux situations. On voit tout de même une faible différence au niveau des amplitudes, qui ne s'inclut cependant pas dans une tendance globale. En effet, l'amplitude ainsi que la longueur d'onde des sinusoïdes apparentes augmentent plus nettement dans les canaux de 3 µm, tandis que leur courbure diminue.

Etant donné que les hyphes ne sont pas vraiment confinées dans les canaux de 3 µm, on peut se demander si l'on observe effectivement des sinusoïdes en 2D ou si les trajectoires incluent aussi une composante en z, qui n'est pas prise en compte pour le moment. On peut aussi se demander si les variations d'amplitude et longueurs d'onde observées ici sont uniquement liées aux effets de confinement ou si d'autres paramètres entrent en jeu.

4.4.3 Variation du diamètre des hyphes

On s'intéresse dans un premier temps au diamètre des hyphes. En effet, pour les canaux de hauteur 1 et 1,5 µm, les hyphes sont généralement confinées car leur diamètre est supérieure à cette hauteur. On peut le vérifier grâce à des images de microscopie confocale qui montrent que les hyphes sont effectivement déformées dans ces canaux, comme sur la figure 4.20. Le diamètre apparent des filaments (vu de dessus) est donc différent de leur diamètre réel.

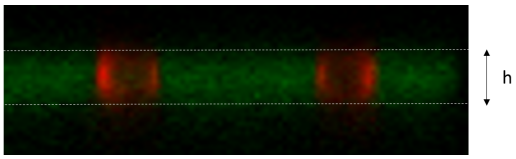


FIGURE 4.20 – Image de microscopie confocale vue de côté. Du dextran fluorescent (vert) a été ajouté au milieu de culture dans la puce, ce qui permet de délimiter les parois de PDMS. Les hyphes sont quant à elles marquées grâce au Calcofluor White (colorisé ici en rouge).

En faisant l'hypothèse de la conservation du rayon de courbure des filaments, et à partir de la hauteur du canal et du diamètre apparent mesuré, il est possible de calculer le rayon réel initial du filament. Ces calculs sont détaillés en annexe E.

On constate alors sur la figure 4.21 que le rayon réel des hyphes est plus faible dans les microcanaux de faible hauteur, ce qui reflète le fait que ce sont les hyphes avec les plus petits diamètres qui parviennent à y pénétrer. Cela induit donc un biais sur les populations d'hyphes présentes dans chaque condition.

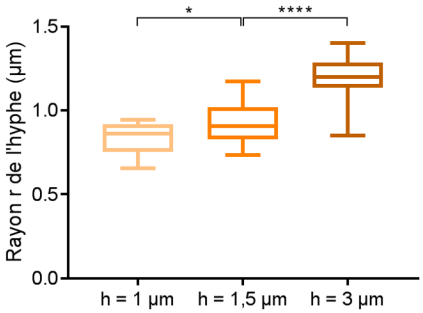


FIGURE 4.21 – Distribution des rayons réels des hyphes pour chaque niveau de confinement, calculés à partir du diamètre apparent pour les microcanaux de 1 et 1,5 µm (n=23, 41, 17 respectivement pour h=1, 1,5 et 3 µm).

4.4.4 Effet de la vitesse de croissance

La vitesse de croissance des hyphes est un des paramètres importants à prendre en compte d'autant qu'il peut varier très largement d'une hyphe à l'autre.

Dans un premier temps, on peut se demander si la vitesse de croissance est liée au niveau de confinement imposé par les microcanaux. La figure 4.22 montre les distributions de vitesse selon la hauteur des canaux, et on ne peut dégager aucune tendance. Notons que seuls les déplacements dans le plan sont pris en compte, la vitesse dans les microcanaux de 3 µm de haut

est donc légèrement sous-estimée. Cependant, l'espace libre dans l'axe z est seulement d'environ 1 µm et en supposant qu'un déplacement en z se produit sur une demi-longueur d'onde, cette différence peut être considérée comme négligeable.

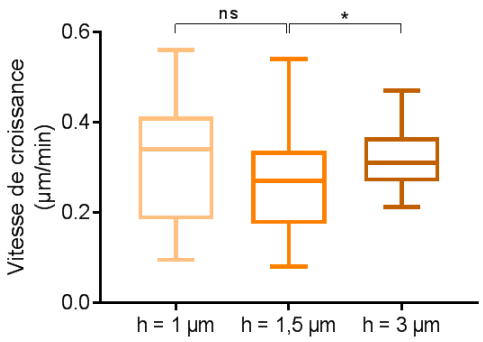


FIGURE 4.22 – Distributions des vitesses de croissance pour chaque niveau de confinement (n=23, 41, 17 respectivement pour h=1, 1,5 et 3 µm).

On peut donc supposer que les variations que l'on voit ici sont des fluctuations autour d'une valeur moyenne de vitesse, fluctuations qui peuvent probablement s'expliquer par la variabilité inhérente entre les expériences (température, concentration de levures etc). Nous allons voir ici que la forme des sinusoïdes dépend de la vitesse de croissance des hyphes, en particulier l'amplitude est corrélée positivement à la vitesse de croissance. Et la vitesse moyenne dans les canaux de 1 µm de haut est légèrement plus élevée que celle à 1,5 µm, ce qui pourrait expliquer la légère différence obtenue en figure 4.19c pour les amplitudes entre les canaux de 1 et 1,5 µm. À l'inverse, la différence d'amplitude avec les canaux de 3 µm ne peut pas s'expliquer uniquement par la différence de vitesse.

La figure 4.23a montre que la forme des sinusoïdes, ici la courbure des hyphes, est corrélée à leur vitesse de croissance : augmenter la vitesse revient à réduire la courbure maximale.

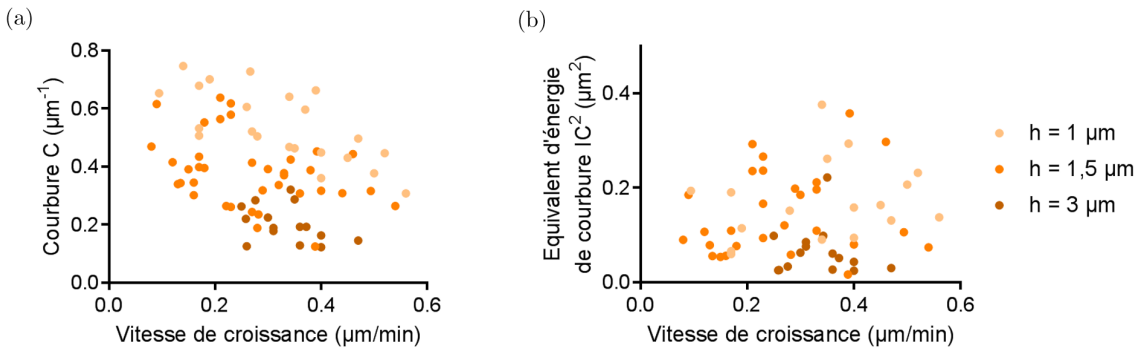


FIGURE 4.23 – (a) Courbure maximale C des trajectoires sinusoïdales en fonction de la vitesse de croissance v, présentant une corrélation négative. (b) Équivalent de l'énergie de courbure IC^2 en fonction de la vitesse de croissance v (n=22, 63, 15 respectivement pour h=1, 1,5 et 3 µm). Cette énergie de courbure ne semble pas dépendre de la vitesse. Des points correspondants aux différents niveaux de confinement, c'est-à-dire aux différentes hauteurs de microcanaux, sont superposés.

En cherchant à expliquer ce phénomène, nous nous sommes également rendus compte que le diamètre des filaments a tendance à augmenter avec cette vitesse. Nous pouvons alors tracer l'énergie de courbure du filament courbé :

$$E_{courbure} = \frac{1}{2} EIC^2 L \propto IC^2 \tag{4.3}$$

avec E le module élastique, I le moment quadratique en flexion, L la longueur du filament et C la courbure. Pour un cylindre plein de rayon r, le moment quadratique I s'écrit :

$$I = \frac{\pi r^4}{4} \tag{4.4}$$

On obtient alors une énergie de courbure proportionnelle à r^4C^2. On peut effectivement comprendre cette énergie dans le sens où il est plus difficile de courber un filament avec un rayon élevé.

Mais comme décrit plus haut, nous devons prendre en compte la véritable géométrie des filaments confinés dans les microcanaux pour le calcul de I. De façon simplifiée, cette géométrie est intermédiaire entre les cas extrêmes d'une ellipse ($I = \pi a^3 b/4$ avec a et b les grands et petits demi-axes) et d'un rectangle de côté égal au diamètre apparent ($I = D^3h/12$). L'utilisation de l'une ou l'autre de ces expressions donne une énergie de courbure de la forme $E_{courbure} \propto D^3hC^2$.

On constate sur la figure 4.23b que cette énergie de courbure ne dépend alors plus de la vitesse de croissance. Cela nous donne donc un invariant physique très important : la courbure maximale que l'hyphe peut adopter est donc fixée par cette constante énergétique et son diamètre. Cette énergie de courbure est toutefois plus faible dans le cas des hyphes non-confinées (3 µm) qu'en situation de confinement (1 et 1,5 µm).

4.4.5 Longueur et durée d'une période

Prenons l'exemple de la figure 4.24 sur lequel une hyphe possédant deux régimes de sinusoïdes est représentée, avec une première section à grande amplitude et une seconde à plus faible amplitude. En traçant sa longueur en fonction du temps, on constate que sa vitesse de croissance varie presque d'un facteur 2 entre ces deux sections. Une vitesse élevée est donc associée à une plus grande amplitude et longueur d'onde, et par conséquent à une longueur parcourue en une période plus grande.

On peut alors tracer cette longueur curviligne L moyenne parcourue en une période en fonction de la vitesse pour chaque hyphe. La figure 4.25a montre bien que la longueur augmente avec la vitesse, et les points correspondants à la figure 4.24 sont également indiqués à titre d'exemple. Cependant, les points ne s'alignent pas vraiment sur une droite passant par l'origine, ce qui aurait pu indiquer une période T est constante. Cette question de la durée d'une période est d'autant plus pertinente que nous verrons par la suite que des oscillations du Spitzenkörper pourraient être liées à ces trajectoires sinusoïdales. Il est donc intéressant de s'intéresser à la fréquence de ces oscillations. La figure 4.25b montre cette fois la durée mise par l'hyphe pour parcourir une longueur d'onde de sa sinusoïde, c'est-à-dire la période T, en fonction de la vitesse.

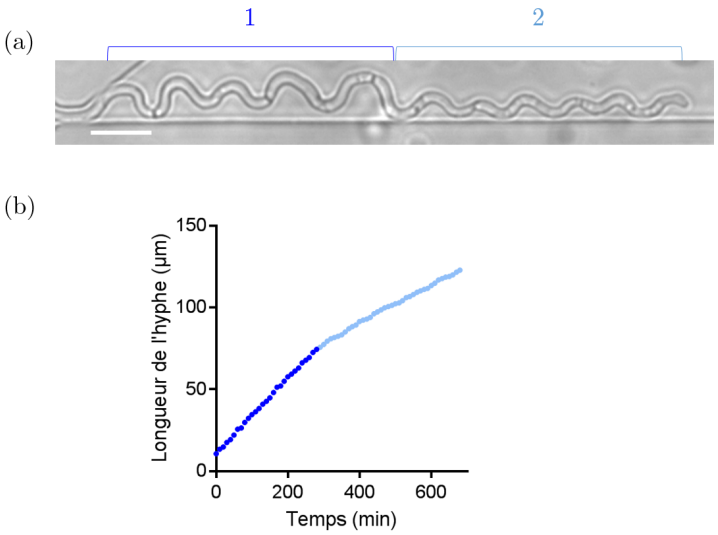


FIGURE 4.24 – Cas particulier d'une hyphe en croissance dans un canal de 1.5 µm présentant deux régimes bien distincts. (a) Image de microscopie sur laquelle ces deux régimes sont visibles par la différence des paramètres de leur trajectoire sinusoïdale. Barre d'échelle : 10 µm. (b) Longueur de l'hyphe en fonction du temps qui montre un changement de vitesse entre ces deux régimes.

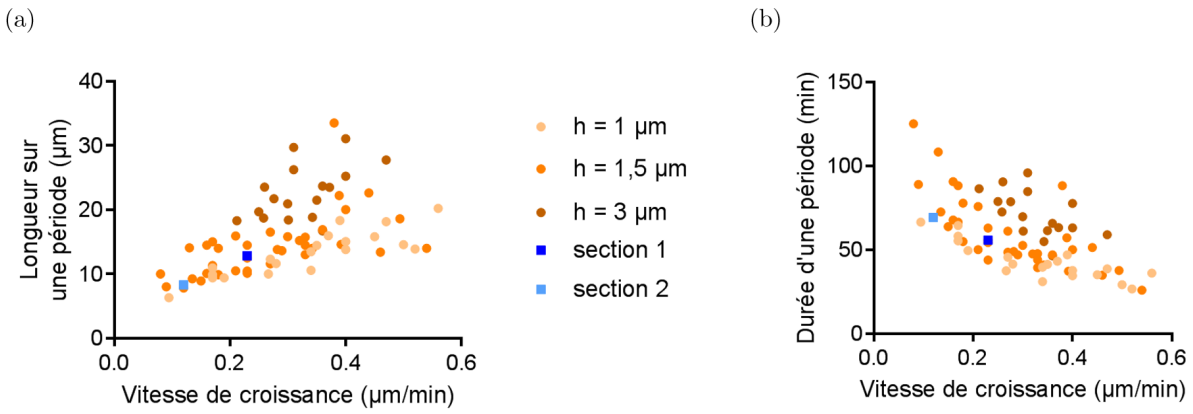


FIGURE 4.25 – Dynamique de la croissance sinusoïdale. (a) Longueur parcourue en une période L en fonction de la vitesse de croissance v. (b) Période T en fonction de la vitesse de croissance v (n=20, 38, 17 respectivement pour h=1, 1,5 et 3 µm). Des points correspondants aux différents niveaux de confinement sont superposés, et ceux de la figure 4.24 sont également spécifiquement indiqués.

On voit que cette période n'est pas constante et augmente pour de faibles vitesses v. Ainsi un filament ayant une croissance très lente prendra plus de temps qu'un filament rapide pour effectuer une période. Cependant, cette augmentation de la durée ne permet tout de même pas d'atteindre une longueur parcourue constante et indépendante de la vitesse, comme nous l'avons vu avec la figure 4.25a.

Cette longueur curviligne augmente donc avec la vitesse, et est associée de la même façon à une augmentation de l'amplitude et de la longueur d'onde.

On remarque également qu'à même vitesse, les filaments en croissance dans les canaux de 3 µm ont une période plus longue et donc une longueur plus grande.

4.4.6 Corrélation entre amplitude et longueur d'onde

On s'intéresse maintenant à la corrélation entre les deux paramètres de la sinusoïde : l'amplitude et la longueur d'onde. Nous avons déjà vu que la courbure C qui est proportionnelle à a/λ^2 n'était pas une constante. On peut alors se demander si le ratio a/λ est quant à lui constant, ce qui correspondrait alors à avoir un angle d'oscillations constant. On peut donc tracer la longueur d'onde λ en fonction de l'amplitude a en échelle logarithmique, comme le montre la figure 4.26.

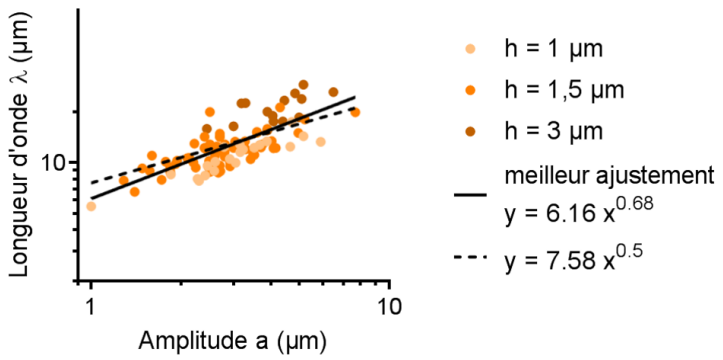


FIGURE 4.26 – Longueur d'onde λ des sinusoïdes en fonction de leur amplitude a en échelle logarithmique (n=22, 63, 15 respectivement pour h=1, 1,5 et 3 µm). Le meilleur ajustement de l'ensemble des points pour les différentes hauteurs de microcanaux donne $\lambda \sim a^{2/3}$. L'ajustement en forçant la pente de la droite à 0,5, correspondant à une courbure $C \sim a/\lambda^2$ constante, est également indiqué à titre de comparaison.

Le meilleur ajustement de ces points donne la relation suivante entre ces deux paramètres :

$$a \sim \lambda^{3/2} \tag{4.5}$$

Cela correspond donc à un comportement intermédiaire entre un angle constant ($a \sim \lambda$) et une courbure constante ($a \sim \lambda^2$). Cela revient également à écrire que $C \sim \lambda^{-1/2}$.

4.4.7 Bilan

En regroupant ces différentes informations, on peut essayer de comprendre cette croissance sinusoïdale. Nous avons vu que la période des sinusoïdes, donc d'oscillations, n'était pas constante, mais qu'elle augmentait fortement pour les faibles vitesses de croissance. On peut considérer qu'il existe une durée minimale T_{min} entre deux oscillations à partir des observations de la figure 4.25. Prenons le cas d'une hyphe à croissance très lente v. Pendant un temps T_{min}, elle parcourait seulement une longueur $L = vT_{min}$, cette longueur serait petite et serait donc associée à une faible longueur d'onde λ. Or on a vu que $C \sim \lambda^{-1/2}$, ce qui signifierait qu'elle devrait adopter une grande courbure, ce qui n'est pas énergétiquement favorable car son énergie de courbure ne pourrait pas dépasser la constante sur la figure 4.23. On peut alors supposer que plutôt que

d'adopter cette trop grande courbure, l'hyphe va poursuivre sa croissance et donc augmenter la durée T avant la prochaine courbure. Cela reviendrait donc à trouver un compromis entre la courbure et la durée fixée d'oscillation.

4.4.8 Autre remarque : position des septums en croissance sinusoïdale

Il avait été mentionné dans la littérature concernant la croissance sinusoïdale que les oscillations pourraient être corrélées au cycle cellulaire, avec des septums localisés au niveau de deux pics successifs [43]. Cela reviendrait à avoir, à partir des paramètres représentés sur la figure 4.27a, $D_{septum} = \lambda$. Cependant, la figure 4.27 qui représente la distance entre deux septums D_{septum} en fonction de la longueur d'onde λ montre que ce n'est pas vraiment le cas.

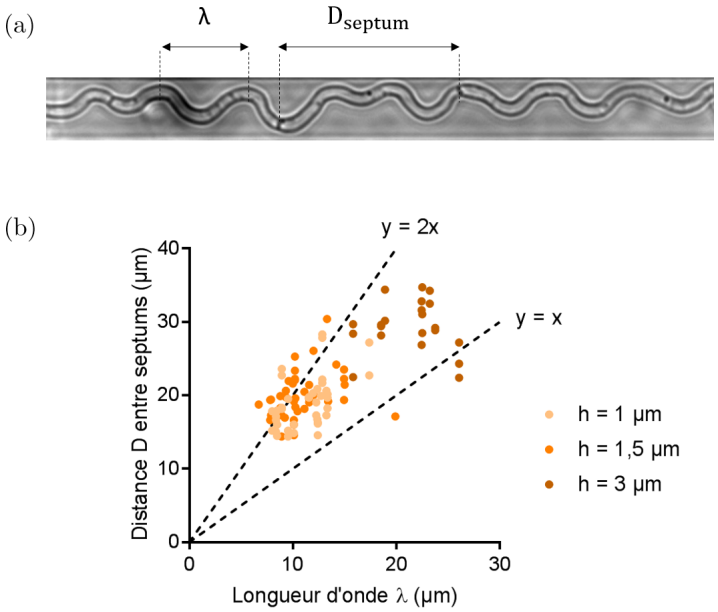


FIGURE 4.27 – Corrélation entre la longueur d'onde des sinusoïdes et la position des septums. (a) Exemple de filament sur lequel on peut distinguer les septums et ainsi mesurer la distance les séparant. (b) Distance entre septums D en fonction de la longueur d'onde moyenne λ du filament (n=40, 40, 21 respectivement pour h=1, 1,5 et 3 µm). Les septums ne semblent pas être localisés spécifiquement au niveau des pics des sinusoïdes.

Pour une certaine forme de sinusoïde (longueur d'onde et amplitude données), il est effectivement possible que la taille moyenne d'un article corresponde à deux fois la longueur parcourue en une période L, comme cela semble être le cas pour les faibles longueurs d'onde. Mais augmenter la longueur d'onde revient à augmenter la longueur parcourue en une période, et donc à réduire ce coefficient car la taille des articles reste relativement homogène. Il ne semble donc pas qu'il y ait une corrélation entre la fréquence des oscillations et la position des septums, c'est-à-dire le cycle cellulaire.

4.4.9 Adaptation aux changements de contraintes

Nous avons vu que les hyphes étaient capables de s'adapter à un changement de substrat en changeant leur mode de croissance de rectiligne sur verre à sinusoïdale sur plastique traité. Nous souhaitons maintenant utiliser les puces microfluidiques pour étudier plus précisément cette adaptabilité en contrôlant le niveau de confinement appliqué sur les hyphes.

Mise en œuvre expérimentale

Pour cela, nous avons réalisé des microcanaux avec des changements de hauteur, comme le montre la figure 4.28. La technique de fabrication de telles structures est détaillée au chapitre 2. Ainsi, des zones de hauteur 1,5 µm, c'est-à-dire des zones de confinement, se succèdent avec des zones de hauteur 6,5 µm où les hyphes ne sont alors plus confinées.

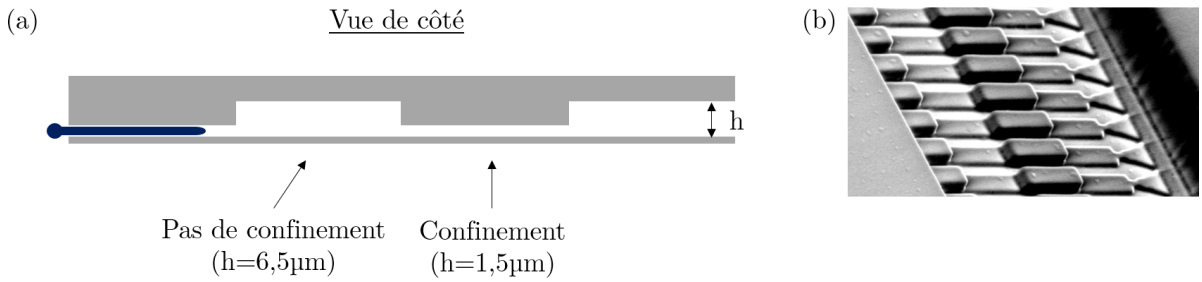


FIGURE 4.28 – Puces microfluidiques réalisées pour étudier l'adaptation des hyphes aux changement de contraintes. (a) Représentation schématique des microcanaux à deux niveaux : le premier de hauteur 1,5 µm et le second de hauteur 6,5 µm. (b) Image de microscopie électronique à balayage montrant le moule utilisé pour réaliser ces canaux, sur lequel on distingue les deux hauteurs différentes.

Observations

On peut alors observer le comportement des hyphes dans ces canaux. Quelques exemples sont représentés sur la figure 4.29. On y distingue nettement le changement de hauteur des canaux, et la direction de croissance des hyphes est indiquée à l'aide des flèches. Comme prévu, des trajectoires sinusoïdales sont observées dans les canaux de 1,5 µm de haut. Et on observe ici de nettes transitions en passant d'une zone non-confinée à une zone confinée : des filaments ayant une croissance plutôt rectiligne initialement pour h=6,5 µm se mettent à osciller en confinement. Ces véritables transitions seront qualifiées de transitions complètes entre une croissance rectiligne et une croissance sinusoïdale ou inversement. Parfois, on observe seulement des transitions partielles, comme sur l'image en haut à gauche, où l'hyphe continue à osciller dans la zone non confinée mais avec une longueur d'onde plus élevée, et avec un déplacement en z.

Relâcher ou imposer brusquement un confinement entraîne donc un changement de comportement des hyphes. La proportion de ces transitions est indiquée sur la figure 4.30 pour les deux situations : un confinement imposé ou un confinement relâché. On remarque qu'imposer un confinement donne très souvent lieu à de véritables changements de mode de croissance, tandis

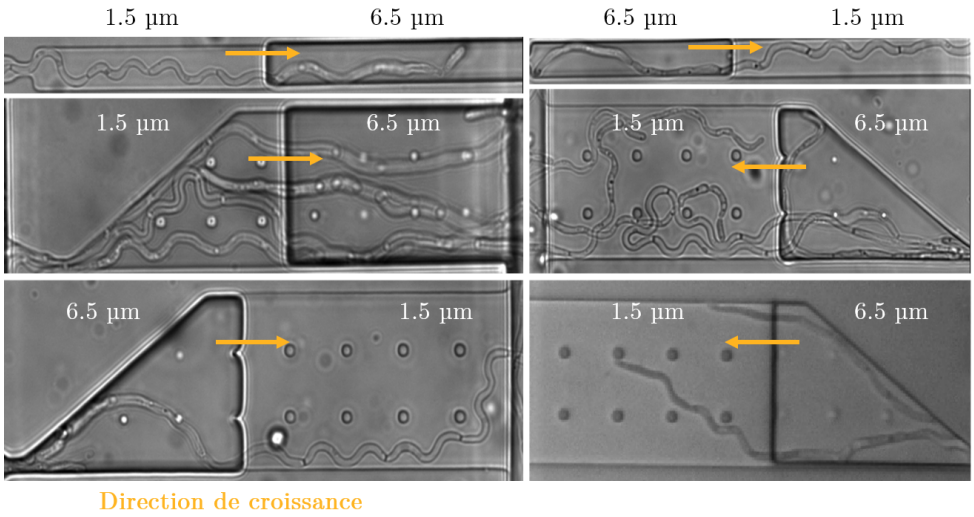


FIGURE 4.29 – Images représentatives d'hyphes ayant subi des changements de contraintes dans les puces avec des microcanaux à 2 hauteurs. La direction de croissance est indiquée par les flèches et permet donc de différencier les filaments ayant été confinés brusquement de ceux qui ont été déconfinés.

que la transition inverse, c'est-à-dire d'une zone confinée à une zone non-confinée, semble un peu moins claire avec une plus grande proportion de transition partielle.

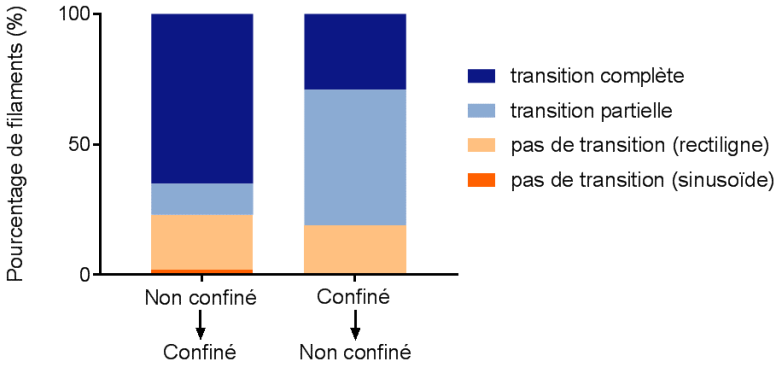


FIGURE 4.30 – Pourcentage de filaments ayant des changements de comportement ou non selon qu'ils passent d'une zone confinée à non-confinée ou inversement. Les transitions complètes ou partielles entre les deux modes de croissance rectiligne ou sinusoïdal sont identifiées.

Cependant, dans la zone non confinée, les hyphes ont suffisamment d'espace pour également se déplacer dans l'axe z, ce qu'on constate d'ailleurs par des changements de focus sur les images de la figure 4.29. Il ne s'agit donc plus ici de trajectoires sinusoïdales purement en 2D. Afin d'observer plus précisément le comportement de ces hyphes, des images de microscopie confocale ont été réalisées à l'aide d'un marquage de leur paroi au Calcofluor White. Une projection des différents stacks en z est représentée en figure 4.31a. Elle montre la présence d'une sinusoïde dans la zone confinée à h = 1,5 µm, et d'une transition partielle avec des oscillations toujours présentes lors du déconfinement. Ces oscillations se font non seulement dans le plan mais également en z,

ce qui donne lieu à une structure hélicoïdale comme illustré sur la figure 4.31b par reconstruction 3D de l'hyphe dans la zone non confinée.

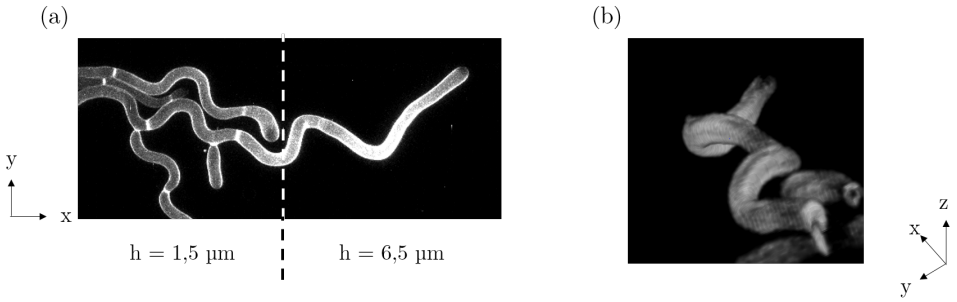


FIGURE 4.31 – Images de microscopie confocale d'une hyphe dans une puce à 2 niveaux avec un marquage au Calcofluor White. (a) Projection des z-stacks qui donne une visualisation uniquement dans le plan. (b) Reconstruction 3D du filament dans la zone à h = 6,5 µm, qui révèle des oscillations également en z, et ainsi une forme d'hélice.

Cette observation est particulièrement intéressante puisqu'on observe ici une croissance hélicoïdale en milieu liquide, c'est-à-dire sans point d'accroche comme cela pouvait être le cas dans le gel d'agar. La croissance sinusoïdale en 2D dans le canal confiné peut donc se transformer en une croissance hélicoïdale en 3D lorsque le filament est déconfiné.

4.5 Changements biologiques associées à ce type de croissance

4.5.1 Spitzenkörper

Le Spitzenkörper a déjà été décrit dans le chapitre 1. Plusieurs exemples, décrits en introduction, semblent indiquer que la position de cet agrégat de vésicules pourrait être liée à la direction de croissance de l'hyphe. Étant donné les changements de direction très marqués de cette croissance sinusoïdale, on souhaite voir ici si des déplacements du Spitzenkörper pourraient être liés à à ces oscillations.

Pour cela, une souche doublement marquée au noyau (Nop1-CFP) et au Spitzenkörper (Mlc1-YFP) a été observée au spinning-disk. Mlc1 correspond à *Myosin light chain* et est localisé au niveau du Spitzenkörper.

La figure 4.32a montre un exemple de croissance sinusoïdale d'une hyphe avec ce marquage du Spitzenkörper. On voit que celui-ci ne reste pas au centre du filament, mais qu'il se déplace effectivement latéralement. De plus, il semble que ce déplacement du Spitzenkörper précède le changement de direction. On peut alors chercher à quantifier ce phénomène.

Pour cela, on repère dans un premier temps l'axe de croissance de l'hyphe à l'instant t et la distance d du centre du signal fluorescent à cet axe (d sur la figure 4.32b) est calculée. Cela correspond donc au déplacement latéral du Spitzenkörper par rapport au centre. Ensuite, on mesure le changement d'orientation de l'hyphe grâce à l'angle α représenté également sur la figure 4.32b. Il correspond à l'angle entre l'apex à l'instant t et l'apex à l'instant suivant $t + dt$ par rapport à l'axe central de l'hyphe à t. Les valeurs de d et α sont prises arbitrairement

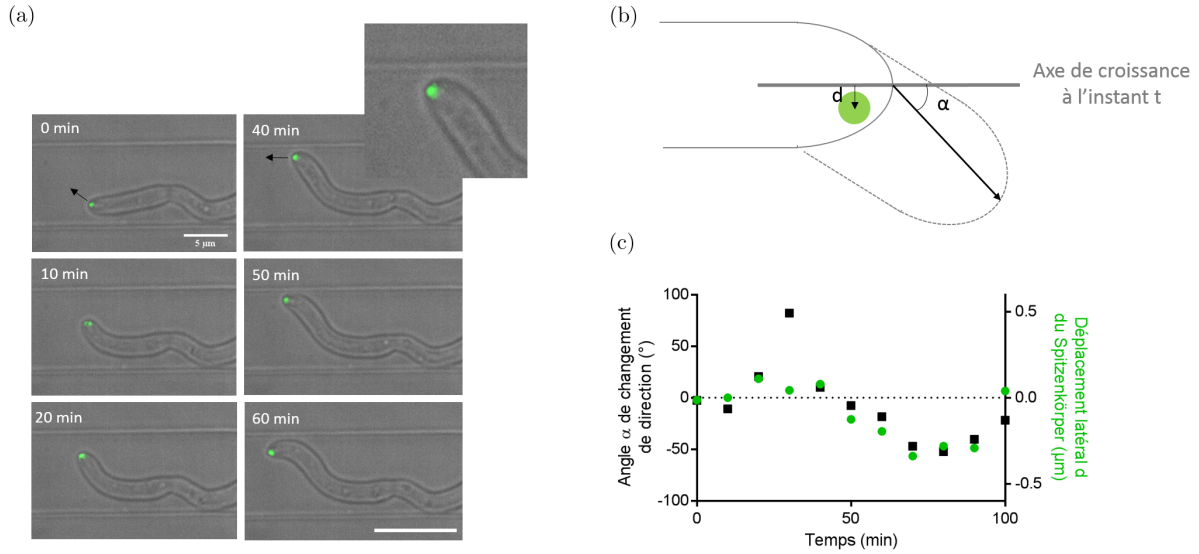


FIGURE 4.32 – Corrélation entre le déplacement latéral du Spitzenkörper et la réorientation de l'hyphe. (a) Exemple d'images successives d'une hyphe ayant une trajectoire sinusoïdale et possédant un marquage fluorescent pour Mlc1. Barre d'échelle : 10 µm (b) Schéma illustrant la mesure des grandeurs d et α. (c) Variation corrélée de l'angle α de changement de direction de croissance et du déplacement latéral d du Spitzenkörper au cours du temps pour l'exemple illustré en (a).

positives pour un déplacement ou une réorientation vers la droite et négatives vers la gauche.

La figure 4.32c représente ces deux paramètres d et α en fonction du temps pour l'exemple présenté ici. On constate une forte corrélation entre ces paramètres, ce qui semble confirmer le fait qu'un déplacement du Spitzenkörper précède un changement de direction de croissance du côté du Spitzenkörper. En effet, d mesure le déplacement à l'instant t tandis que α correspond à la réorientation entre t et $t + dt$ et donc suit ce déplacement.

Ces résultats sont toutefois représentés ici seulement pour un exemple représentatif d'hyphe, et l'analyse d'un plus grand nombre de filaments devrait être effectuée pour confirmer cette observation.

4.5.2 Paroi

Relation entre l'intensité de Calcofluor White et la courbure

Nous avons déjà vu que le CFW marque la chitine de la paroi des champignons, et l'exemple de la figure 4.33a correspond à une projection où l'on a sommé l'intensité de tous les plans en z d'images de microscopie confocale. On peut remarquer sur cette image que l'intensité à l'intérieur des courbures est plus grande qu'à l'extérieur, comme le montre le tracé de l'intensité au niveau de la ligne blanche (figure 4.33b).

On souhaite donc étudier s'il y a une corrélation entre l'intensité de part et d'autre des hyphes et leur courbure. Pour cela, nous avons développé une méthode automatisée utilisant Fiji et Matlab. A partir de la forme du filament, des fits circulaires successifs sur des portions de

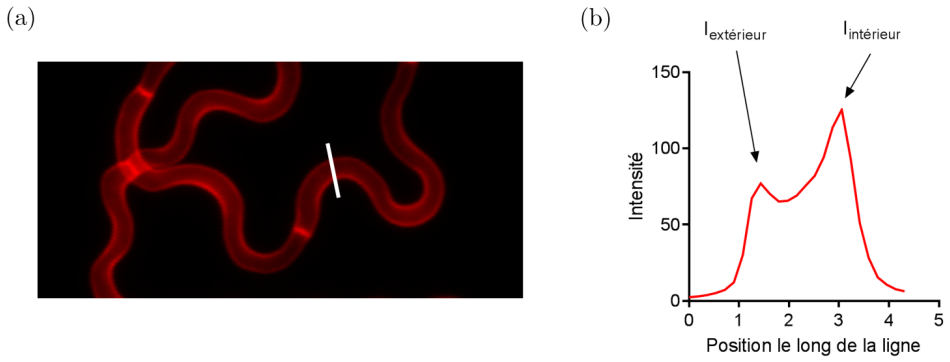


FIGURE 4.33 – (a) Image de microscopie confocale d'hyphes dans un canal de 1,5 µm de hauteur avec un marquage au Calcofluor White (ici en rouge pour une meilleure visibilité). (b) Profil d'intensité le long de la ligne blanche montrant la différence d'intensité au niveau de la paroi entre l'intérieur et l'extérieur de la courbure.

courbe permettent d'obtenir la courbure en chaque point. Ensuite, avec Matlab, la normale à la trajectoire en chaque point est tracée ainsi que le profil d'intensité le long de cette normale. Les deux principaux pics de ce profil I_1 et I_2 correspondent à l'intensité de chaque côté du filament. La figure 4.34b représente la différence d'intensité normalisée entre les deux côtés $\Delta I = \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2}$ en fonction de la courbure pour chaque point.

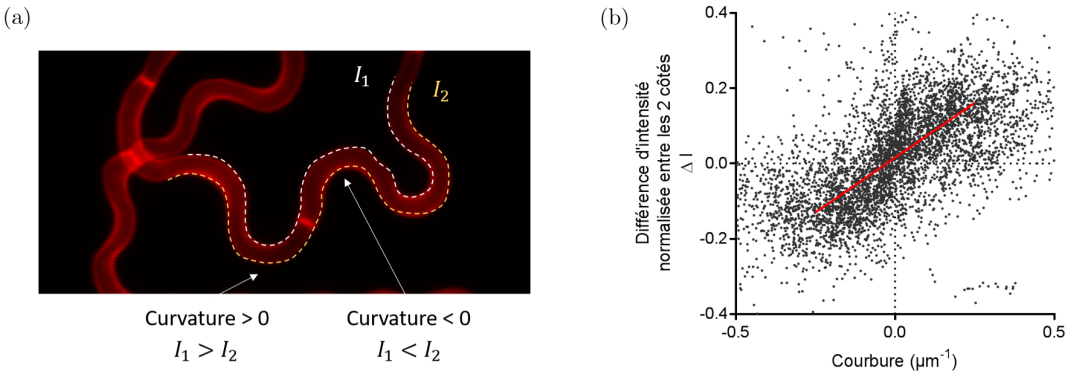


FIGURE 4.34 – Corrélation entre intensité et courbure. (a) Exemple de la figure 4.33 sur lequel I_1 et I_2 correspondent à l'intensité de part et d'autre de l'hyphe. Une courbure positive correspond ici à $I_1 > I_2$, à savoir $I_{intérieur} > I_{extérieur}$. (b) Différence d'intensité normalisée entre les deux côtés des hyphes $\Delta I = \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2}$ en fonction de la courbure. Chaque point correspond à un point le long de la trajectoire pour lequel est calculée la courbure avec un ajustement circulaire ainsi que la différence d'intensité selon la normale.

On voit que pour une courbure positive, ΔI est également positif, c'est-à-dire $I_1 > I_2$. Et cela correspond, comme on le voit sur la figure 4.34a, à $I_{intérieur} > I_{extérieur}$. Et plus la courbure est grande, plus la différence d'intensité augmente également.

Les données présentées ici correspondent aux filaments en confinement, c'est-à-dire avec une trajectoire en 2D. Cependant, nous avons vu que ce n'est pas toujours le cas, et ils peuvent

adopter une forme hélicoïdale. On peut alors se demander si cette observation serait toujours valable en 3D. Si le maximum d'intensité se situe à l'intérieur des courbures de la même façon pour les hélices, on devrait alors observer une rotation de ce maximum, plutôt qu'une simple oscillation. Des coupes transversales successives le long d'une hélice sont représentées en figure 4.35. On se trouve ici à de faibles dimensions, et la résolution de ces images, particulièrement en z, ne permet pas de quantifier proprement l'intensité sur le contour de l'hyphe. Il semble tout de même qu'il y ait sur ces images un déplacement du maximum d'intensité sur ce contour (dans le sens horaire), qui serait en accord avec une position à l'intérieur de l'hélice. Mais de nouvelles acquisitions et de plus amples analyses seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

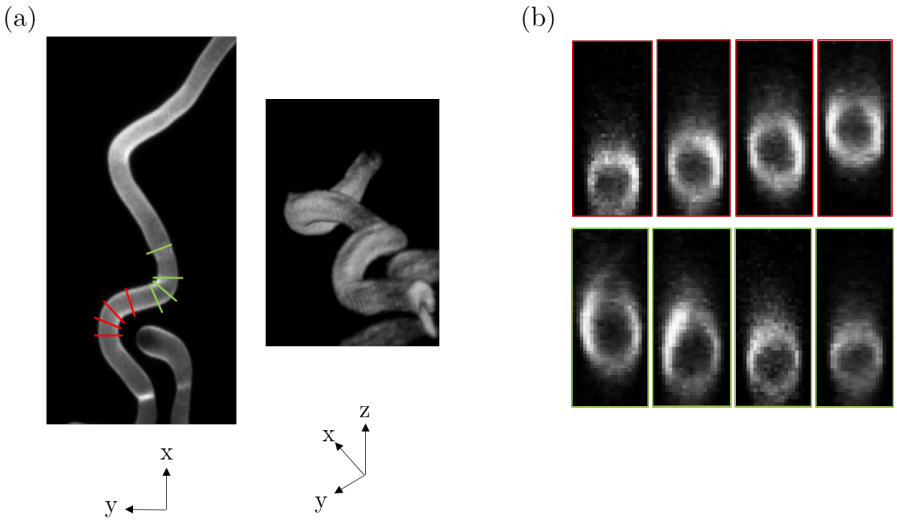


FIGURE 4.35 – Hyphe formant une hélice en vue de dessus et reconstruction 3D (a) pour laquelle des coupes transversales sont réalisées (b).

4.6 Discussions et perspectives

4.6.1 Conditions d'observations

Nous avons donc vu dans ce chapitre qu'il est possible d'induire une croissance sinusoïdale ou hélicoïdale chez les hyphes de *C. albicans*, non seulement dans un milieu de type gel comme cela a été décrit dans la littérature, mais de façon plus surprenante également en milieu liquide.

Dans un premier temps, nous avons vu que les hyphes adoptent une morphologie de type hélicoïdale au sein du gel, et plutôt sinusoïdale aux interfaces où elles se maintiennent principalement en 2D. Cependant, ce point reste encore à vérifier car il n'est pas exclu que les formes sinusoïdales que l'on observe possèdent en réalité une composante en z. Mais un gel est une structure complexe pour laquelle de nombreux paramètres difficiles à contrôler entrent en jeu. Des travaux sur l'adhésion de gels déposés sur des substrats montrent qu'elle dépend par exemple de la nature du substrat ou de sa rugosité [110]. De plus, le gel étant constitué essentiellement d'eau, des films d'eau peuvent également avoir un rôle au niveau de cette interface. Même si

nous n'avons pas étudié en détail les propriétés de ce gel, nous avons tout de même montré l'effet de la contrainte imposée par le milieu environnant, par l'intermédiaire de la rigidité ici, sur l'induction de la croissance sinusoïdale. Des changements de substrat sur lequel est déposé le gel fournissent également la preuve de l'effet de la nature de cette surface, et probablement de l'affinité des champignons pour celle-ci.

Nous pouvons en effet montrer avec des expériences indépendantes que ces deux aspects contribuent à l'apparition de ces oscillations.

D'une part, des sinusoïdes apparaissent en milieu liquide en contact avec une seule surface particulièrement adhésive telle qu'une boîte de Pétri pour culture cellulaire. Ici c'est donc uniquement l'adhésion/l'affinité des hyphes au substrat qui semble déclencher ce mode de croissance.

D'autre part, une transition vers cette croissance sinusoïdale/hélicoïdale est observée dans des puces microfluidiques sous confinement. En particulier, un confinement important (hauteur de canal inférieure au diamètre des hyphes) résulte en des oscillations en 2D. A la sortie de ce confinement, des hauteurs de canaux de l'ordre de 6 µm nous permettent de voir des oscillations en vue de dessus mais présentent aussi des mouvements en z, donnant alors lieu à des formes hélicoïdales.

L'utilisation de puces à hauteur variable dans un même canal nous a permis de montrer la capacité d'adaptation des hyphes de *C. albicans* à leur environnement physique. On observe ainsi des changements de comportement selon qu'elles soient confinées ou non, de la même façon qu'elles passent à un mode oscillatoire lorsqu'elle sont transférées du verre à une boîte de Pétri. Cette adaptabilité semble en accord avec les premières observations de transition effectuées par changement de température ou d'environnement décrits en introduction [174]. Pour aller plus loin dans cette modulation de l'environnement, on pourrait aussi envisager d'utiliser des valves de Quake. Le principe est représenté sur la figure 4.36, il s'agit de positionner un canal au dessus du canal contenant les hyphes. La pression appliquée dans ce canal supérieur ainsi que l'utilisation d'une membrane flexible permettent alors d'appliquer une pression sur les filaments. On pourrait varier le niveau de confinement des hyphes à la demande, et observer leur réponse.

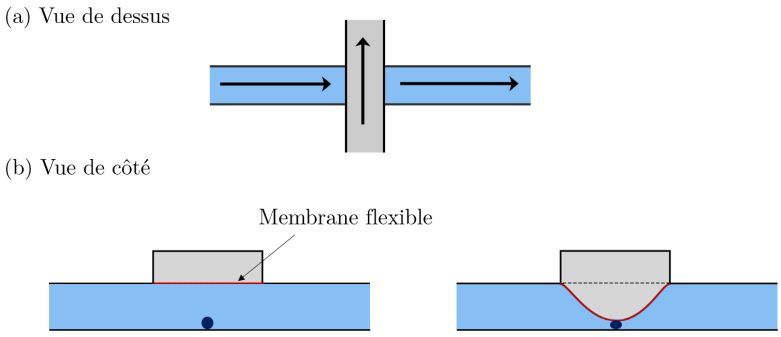


FIGURE 4.36 – Représentation schématique du principe des valves de Quake qui pourrait être utilisé pour moduler le confinement appliqué aux hyphes.

4.6.2 Forme adoptée : sinusoïdes ou hélices ?

Nos premières observations portaient principalement sur des interfaces ou du confinement en 2D, suggérant la présence de sinusoïdes dans le plan. Cependant, nous avons vu dans les canaux de 6,5 µm de haut que ces oscillations sont également présentes selon l'axe z, résultant en une forme hélicoïdale. On peut alors supposer qu'à un niveau de confinement intermédiaire de 3 µm, on observe en réalité des sortes d'hélices aplaties, ce qui nécessiterait de nouvelles observations en microscopie confocale. Mais que se passe-t-il alors lorsque les hyphes sont complètement écrasées en 2D ? Nous avons vu que les amplitudes et longueurs d'onde des sinusoïdes confinées étaient plus petites que celles des sinusoïdes/hélices dans les canaux de 3 et 6,5 µm. À cela est associée une courbure plus importante, et une période plus courte. La variation de la période de ces oscillations en particulier semble indiquer qu'il ne s'agit pas simplement d'un "aplatissement" des hélices, auquel cas, la période resterait la même et seule la longueur parcourue pourrait varier. Cela suggère plutôt un véritable changement de comportement de l'hyphe lorsqu'elle est confinée, ce qui signifierait qu'elle est capable de "sentir" ce confinement.

4.6.3 Initiation de ce mode de croissance

La question fondamentale est ici de déterminer l'origine de ce mode de croissance. L'adhésion et le confinement semble tous deux être capables de déclencher cette croissance sinusoïdale. Un point commun potentiel pourrait être la friction ou plus généralement le contact avec une ou deux surfaces. L'énergie d'adhésion est ainsi augmentée pour les différentes situations discutées plus haut : soit par l'intermédiaire de l'affinité avec le substrat, soit par une augmentation de la surface de contact.

Mais un autre paramètre doit aussi être pris en compte : il s'agit du milieu de culture environnant. En effet, nous avons déjà mentionné le fait que les hyphes semblent croître de façon rectiligne dans les premières heures de croissance, tandis qu'on peut voir ensuite des sinusoïdes. Notons cependant que cette observation est difficilement vérifiable pour les très faibles hauteurs de canaux car les hyphes mettent alors assez longtemps avant d'y pénétrer. Dans la littérature décrite en introduction, plusieurs études semblent indiquer que des hyphes en croissance dans un milieu pauvre en nutriments seraient plus sensibles aux changements de topographie, et plus susceptibles de former des sinusoïdes [169] [43]. En effet, des milieux de culture différents mènent à différentes compositions de paroi qui peuvent alors avoir des sensibilités à l'environnement variables.

Ainsi, alors que toutes les expériences présentées ici ont été réalisées en milieu SC/GlcNac, l'utilisation d'un milieu différent et plus riche (YPD avec 10% de sérum) semble être associé à une plus faible propension à croître sous forme sinusoïdale. On peut alors se demander si un appauvrissement du milieu entraînerait une plus grande sensibilité des filaments aux divers stimuli mécaniques appliqués ici, à savoir l'adhésion ou le confinement, ce qui favoriserait ensuite une réponse oscillatoire.

Mais étonnamment, les hyphes sur substrat adhésif se mettent à osciller très rapidement, alors que dans cette situation le ratio milieu sur champignons est bien plus élevé que dans les

puces, ce qui correspond à un milieu qui se dépléte beaucoup moins rapidement.

Cela nous amènerait à penser que l'induction de la croissance sinusoïdale est une combinaison de ces deux facteurs : un milieu relativement pauvre et une contrainte physique de type adhésion ou confinement. Un milieu pauvre aurait besoin d'une très faible contrainte pour déclencher ces oscillations, tandis qu'une contrainte importante, comme une très forte adhésion, pourrait former des sinusoïdes quel que soit le milieu.

Nous nous sommes assez peu focalisés sur cette question de nutriments dans cette étude, et de nouvelles expériences seraient nécessaires afin de mieux comprendre ce phénomène. Pour le moment, nous avons essayé de renouveler le milieu en permanence, à l'aide d'un flux continu, mais cela semble affecter la filamentation des hyphes. Nous avons toutefois vu que lorsque la croissance sinusoïdale a commencé, un renouvellement de milieu n'induit pas de changement de comportement. À l'inverse, et peut-être plus simplement, un milieu déjà déplété pourrait aussi être utilisé, c'est-à-dire extrait d'une puce dans laquelle des hyphes croissent sous forme sinusoïdale, afin de voir si dans ce cas, l'induction des oscillations se produit plus rapidement.

On peut également se demander si les hyphes ne présenteraient pas de base de faibles mouvements du Spitzenkörper, comme cela a été décrit avec *N. crassa* [38]. Elles pourraient alors avoir une croissance légèrement hélicoïdale de façon générale, mais avec des amplitudes trop faibles pour être vraiment visibles. Et on peut imaginer que des perturbations extérieures pourraient entraîner une amplification de ces mouvements et par conséquent de plus grandes amplitudes d'oscillations. Ces perturbations incluraient alors une forte adhésion, un confinement entre deux parois ou un contact avec un gel par exemple. Nous avons également pu observer quelques transitions entre croissance rectiligne et croissance sinusoïdale en conditions de confinement au moment d'un contact avec des piliers, qui en entraînant une asymétrie au niveau de l'apex, pourrait aussi amplifier les oscillations.

4.6.4 Mécanismes mis en jeu

On se propose à présent d'aborder des pistes concernant les mécanismes potentiellement responsables de ce phénomène. Le Spitzenkörper semble être un bon candidat, c'est en effet un complexe de polarité qui joue à priori un rôle dans la direction de croissance de l'hyphe, comme discuté en introduction. Et nous avons vu qu'en situation de confinement 2D, il semble se déplacer latéralement avant le changement de direction. Des expériences supplémentaires seraient toutefois nécessaires pour valider cette observation, d'autant qu'une autre étude sur *C. albicans* suggère que la position du Spitzenkörper ne prédirait pas systématiquement la direction de croissance [64].

Afin de mieux comprendre les implications de ce déplacement du Spitzenkörper, il est nécessaire de se pencher plus précisément sur la façon dont l'hyphe croît, et particulièrement sur l'assemblage et l'expansion de la nouvelle paroi à l'apex. Nous avons déjà discuté du rôle des vésicules contenant du matériel destiné à la synthèse de la paroi, ainsi que du Spitzenkörper en tant que *vesicle supply center*. Mais que se passe-t-il vraiment au niveau de la synthèse de la paroi ? Deux modèles ont été développés. Le premier considère que la paroi est rigide par

nature, et afin d'insérer le nouveau matériel, il est nécessaire d'avoir des enzymes pour l'assouplir, c'est-à-dire d'y casser des chaînes [34]. Dans le même temps, des enzymes agiraient pour synthétiser la nouvelle paroi. Cela correspond ainsi à un équilibre entre la lyse et la synthèse de la paroi. Le second modèle fait l'hypothèse que la paroi est par nature plastique, elle peut donc être relativement souple à l'apex, et se rigidifie progressivement dans la région subapicale par réticulation des polymères, à l'aide d'autres enzymes [200].

Plusieurs pistes ont été suggérées afin de justifier ces deux modèles, mais aucun n'a été véritablement réfuté. Ces deux visions peuvent alors être prises en compte dans un seul modèle de croissance à l'apex : des enzymes participeraient à la rupture de chaînes de polymères de la paroi à l'apex, ce qui permettrait l'addition du nouveau matériel, et finalement d'autres enzymes réticuleraient les composants de la paroi de façon à la rigidifier.

La figure 4.37a représente schématiquement ce modèle de croissance, en incluant également l'agrégat de vésicules que constitue le Spitzenkörper et qui distribue ces vésicules dans toutes les directions.

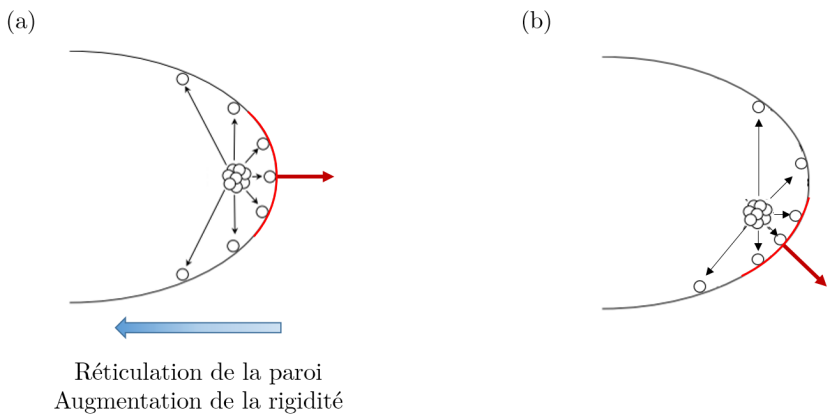


FIGURE 4.37 – Représentation schématique du modèle de croissance hyphale impliquant le Spitzenkörper, qui distribue à l'apex les vésicules contenant différents types d'enzymes. Adapté de [33].

Si l'on considère à présent un déplacement latéral du Spitzenkörper, comme indiqué sur la figure 4.37b, la répartition des vésicules est modifiée avec une plus grande concentration de ce côté. Les enzymes étant transportées par ces vésicules, on peut alors supposer que l'assouplissement de la paroi se produit à cet endroit, ce qui entraîne l'expansion de la paroi dans cette direction à cause de la pression de turgescence. Ceci est cohérent avec le changement de direction précédé par le déplacement latéral du Spitzenkörper constaté dans nos expériences. On pourrait alors comprendre nos observations concernant une plus grande intensité de Calcofluor White à l'intérieur des courbures par le fait qu'une plus grande quantité de vésicules par unité de surface est fusionnée du côté de l'intérieur de la courbure adoptée par l'hyphe. La synthèse de la paroi serait alors suivie de sa rigidification par réticulation dans la région subapicale.

On observe parfois lors de la croissance de sinusoïdes des mouvements brusques de changement de direction. Un exemple d'hyphe en croissance est représentée sur la figure 4.38. Pendant les 10 premières minutes, l'hyphe progresse de façon rectiligne, mais entre les images à 10 et

15 minutes, on voit un mouvement de courbure très rapide. Et en superposant les trajectoires à chaque instant (figure 4.38b), on remarque aussi que l'hyphe s'est vraiment déplacée, c'est-à-dire qu'il n'y a pas simplement eu une réorientation à l'apex, mais également un mouvement au niveau subapical. En voyant ce mouvement, on peut se demander s'il s'agit ici d'une sorte de contraction du côté droit de l'hyphe, qui devient par la suite l'intérieur de la courbure. Est-ce que cela pourrait alors correspondre à une rigidification de la paroi plus importante du côté de la courbure ?

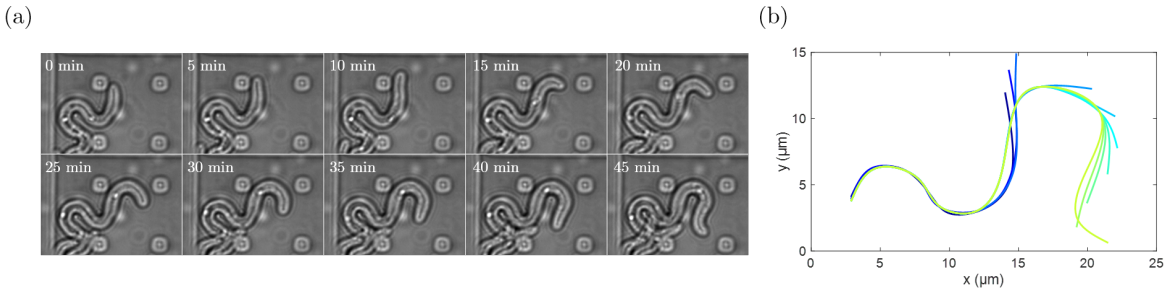


FIGURE 4.38 – Étude de la trajectoire des hyphes en croissance. (a) Images successives de la croissance sinusoïdale d'une hyphe en confinement. (b) Superposition des trajectoires correspondantes afin de visualiser les changements d'orientation.

Les observations réalisées ici correspondent au cas de confinement 2D, c'est-à-dire où l'on a uniquement des oscillations dans le plan. On peut alors se demander comment cette analyse se translaterait aux hélices en 3D. Si l'on garde l'hypothèse du mouvement du Spitzenkörper, cela signifierait qu'il y a alors non plus une oscillation latérale mais une rotation de celui-ci au niveau de l'apex. Cela nécessiterait l'utilisation de technique d'imagerie plus poussée afin de distinguer des déplacements également en z. Mais alors la rotation se transformerait-elle en simple translation en confinement 2D ? ou pourrait-on également détecter des déplacements en z dans ce cas ? En effet, une rotation du Spitzenkörper en confinement 2D se traduirait tout de même par une croissance sinusoïdale puisque les parois bloquent la croissance dans l'axe z.

Enfin, si la courbure des hyphes est effectivement liée au déplacement du Spitzenkörper, il reste à déterminer pourquoi et comment celui-ci se déplace au niveau de l'apex. Des perturbations de l'environnement physique pourraient certes induire une amplification des mouvements, mais cela n'expliquerait pas d'où vient la rotation ou l'alternance droite/gauche des mouvements. Cela soulève la question d'un éventuel mécanisme de rétroaction, qui déplacerait le Spitzenkörper ou qui serait lié à la rigidification de la paroi intérieure à la courbure, privilégiant alors l'expansion de paroi à un endroit où elle est plus souple. L'actine, par sa présence à l'apex sous forme de filaments entre le Spitzenkörper et le polarisome et par ses propriétés de contractilité, pourrait par exemple être un acteur de cette rétroaction.

4.6.5 Autres perspectives

Identification des gènes impliqués

Afin de déterminer l'origine de cette croissance sinusoïdale ou hélicoïdale, il serait intéressant de déterminer si certains gènes en particulier sont responsables de ce comportement. Pour cela, un criblage de mutants pourrait être réalisé. Nous avons déjà testé diverses souches dans ces conditions, et jusqu'à présent elles présentaient toutes un phénotype de type sinusoïdal. En particulier, nous avons testé la souche Δ*msb2* pour laquelle la protéine de surface Msb2 est délétée. Plusieurs études ont montré chez *C. albicans* que cette mucine était impliquée dans la constitution de la paroi, et sa délétion réduit la virulence [201] [202]. De plus, cette protéine semble agir comme un récepteur mécanosensible dans des expériences de compression de *S. cerevisiae* [203]. Étant donné l'importance de l'adhésion et du confinement dans l'apparition des oscillations, cette souche nous a semblé être un bon candidat. Cependant, une croissance sinusoïdale est toujours observée. De même, la souche Δ*als3* qui correspond à une délétion d'une des protéines d'adhésion majeures présente toujours ce même phénotype en croissance sur une boîte de Pétri.

Un point important sur lequel nous ne nous sommes pas penchés pour cette étude concerne le calcium. En effet, comme évoqué au chapitre 1, le calcium favoriserait la fusion des vésicules à la membrane plasmique. Ainsi la régulation spatiale de la concentration de calcium pourrait jouer un rôle majeur dans l'orientation de la croissance des hyphes, probablement en complément du rôle du Spitzenkörper. Nous avons effectivement vu en introduction que des protéines liées aux canaux calciques semblent nécessaires à l'induction de ce mode de croissance [43].

Une autre possibilité consiste à comparer un séquençage de l'ARN (*RNA seq*) d'hyphes en croissance rectiligne normale, et d'hyphes en croissance sinusoïdale/hélicoïdale. Cela nous permettrait de détecter les gènes spécifiquement exprimés pour ce type de croissance. Cela nécessiterait cependant de parvenir à extraire ces hyphes sinusoïdaux, ce qui semble assez difficile à partir des puces microfluidiques mais pourrait potentiellement être réalisé en raclant les filaments adhérant sur une boîte de Petri par exemple.

Lien avec la virulence

Une question fondamentale concernant ce type de croissance concerne son intérêt : est-il avantageux pour les hyphes de croître de façon hélicoïdale ou sinusoïdale en confinement ? On peut imaginer que le modèle de l'hélice, de la même façon qu'un tire-bouchon, pourrait faciliter la pénétration dans l'objet en question sans glisser à l'intérieur de celui-ci. Des oscillations pourraient aussi permettre une exploration plus efficace qu'une simple croissance rectiligne, de façon à détecter par exemple des interstices pour s'y insérer. En ce sens, il semble finalement assez cohérent que ce type de croissance soit déclenché dans des conditions de confinement ou d'adhésion forte, car ce sont des signaux favorables pour l'invasion. Cependant, très peu d'observations *in vivo* permettent pour le moment de constater ce phénomène.

Ainsi, un projet annexe mené dans le laboratoire a pour objectif d'étudier l'interaction des hyphes de *C. albicans* avec des cellules épithéliales par exemple. L'idée est de pouvoir observer

avec une bonne résolution la forme des hyphes lors de la pénétration des cellules. Plutôt que de déposer simplement des levures sur un tapis de cellules épithéliales, ce qui rend la visualisation assez difficile, la méthode envisagée ici consiste à obtenir une paroi verticale recouverte de cellules. Pour cela, des structures de polymères peuvent être photopolymérisées au sein d'un canal microfluidique, et recouvertes spécifiquement de protéines d'adhésion sur lesquelles peuvent venir se fixer les cellules épithéliales, comme illustré sur la figure 4.39a. De plus, la structure correspond à un gel dont la rigidité peut être modulée pour se rapprocher de la situation *in vivo* de matrice extracellulaire. On peut même envisager d'aller encore plus loin en faisant croître un tissu épithélial sur ce gel, puis une couche de cellules endothéliales débouchant sur un canal dans lequel un flux peut être appliqué de façon à simuler la circulation sanguine, comme l'indique la figure 4.39b.

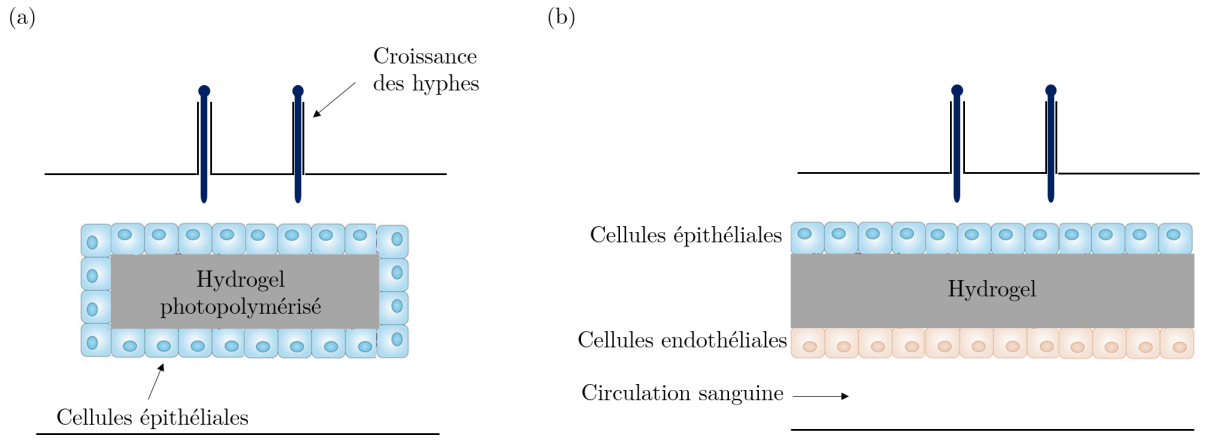


FIGURE 4.39 – Principe schématique (en vue de dessus) envisagé pour étudier l'interaction de *C. albicans* avec des cellules épithéliales (a), voire dans un système encore plus proche du modèle *in vivo* avec un tissu épithélial et endothélial ainsi qu'un écoulement.

En lien avec la virulence, il a été évoqué dans la littérature que les hyphes ayant une croissance sinusoïdale auraient une meilleure résistance aux échinocandines [174]. Or ce sont les antifongiques qui inhibent la synthèse de β-glucanes dont fait partie la caspofungine. Ces observations restent toutefois à confirmer. Nous avons vu dans nos expériences que les hyphes avaient plus tendance à osciller en milieu SC/GlcNac qu'en milieu riche YPD/sérum. Un traitement à la caspofungine a également été effectué et semble affecter plus fortement les hyphes en croissance en milieu YPD/sérum. Cette observation semble aller dans le même sens, mais en réalité il est difficile de savoir si c'est véritablement le comportement sinusoïdal qui est responsable de cette plus grande résistance ou simplement la différence de composition de paroi entre ces deux milieux de culture. En effet, la chitine est formée à partir de la N-acétylglucosamine, et on peut donc supposer que la paroi dans ce milieu aurait une plus grande proportion de chitine, et il a été montré qu'une quantité élevée de chitine dans la paroi réduit la sensibilité à la caspofungine [204].

On peut ainsi se demander si un changement de composition de paroi (moins de β-glucanes et plus de chitine) pourrait induire plus facilement une croissance sinusoïdale, qui serait alors moins

sensible à ce traitement antifongique. Cependant, il a été montré que des mutants présentant des changements drastiques de quantité de chitine dans la paroi pouvaient croître également de façon sinusoïdale dans les mêmes conditions [43]. Au contraire, la formation de sinusoïdes semble beaucoup plus affectée par des altérations au niveau des mannanes (composant externe de la paroi).

4.6.6 Conclusions

Nous avons donc pu observer un comportement sinusoïdal ou hélicoïdal assez robuste, dans une grande variété de conditions. Cependant, ce phénomène reste encore très peu étudié et compris. À l'aide de puces microfluidiques spécifiques, une caractérisation plus systématique de ce mode de croissance a pu être réalisée. De nombreux paramètres entrent en jeu : le diamètre des hyphes, leur vitesse de croissance, l'amplitude et la longueur d'onde des sinusoïdes ou encore leur période. Finalement, un paramètre important semble émerger : l'énergie de courbure des filaments, qui fixe la courbure maximale qu'ils peuvent adopter. Nous avons également exploré quelques pistes de mécanismes biologiques pouvant être à l'origine de ce comportement, notamment des mouvements du Spitzenkörper. Mais de nombreuses questions se posent encore sur d'éventuels mécanismes impliquant l'actine ou le calcium par exemple.

CHAPITRE 5

CYCLE CELLULAIRE

Les vrais scientifiques savent qu'on ne sait rien et que plus on avance, plus on s'aperçoit de son ignorance.

Bernard Werber

5.1 Introduction

L'une des grandes questions en biologie concerne la régulation de la taille des cellules. Les cellules de différents organismes peuvent varier largement en taille, cependant pour un même individu, elles parviennent à maintenir une taille stable. Par exemple, la variation de la distribution de taille au moment de la division pour *E. coli* est seulement d'environ 10% [205]. De nombreuses études se sont donc intéressées à cette question : comment la taille d'une cellule est-elle déterminée et régulée de façon à assurer l'homéostasie ? Cela doit nécessairement passer par une certaine coordination entre sa croissance et son cycle cellulaire, dont nous présenterons quelques mécanismes ici.

5.1.1 Cycle cellulaire

Avant de chercher à expliquer les mécanismes de contrôle de la taille, nous allons commencer par détailler le processus du cycle cellulaire, et notamment les différents évènements le composant.

Les différentes phases

Le cycle cellulaire correspond aux différentes étapes menant à la division d'une cellule-mère en deux cellules-filles. Il comprend donc une phase de croissance et de préparation à la division (interphase) et une phase de division (mitose). Un cycle cellulaire complet est représenté sur la figure 5.1.

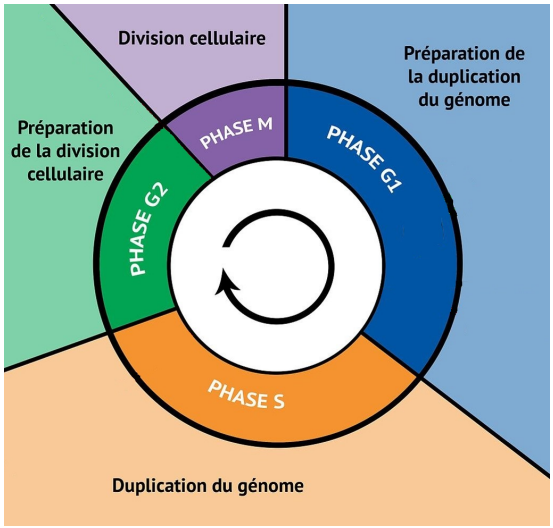


FIGURE 5.1 – Représentation schématique d'un cycle cellulaire avec l'interphase comprenant les phases G1, S et G2 et la mitose (phase M) [206].

L'interphase représente la majeure partie de la vie de la cellule, qui croît et se prépare à la division. Elle est constituée de 3 phases distinctes. La phase G1 correspond à la première phase après la naissance de la cellule. Elle synthétise alors de l'ARN, des protéines, augmente son nombre d'organelles, et également sa taille. La phase S quant à elle correspond à la duplication du génome : la quantité d'ADN est donc doublée à la fin de cette étape. Elle est suivie de la phase G2 qui est une nouvelle étape pendant laquelle la cellule se prépare à la mitose. Ensuite vient la mitose, dont les étapes caractéristiques incluent la prophase, métaphase, anaphase et télophase. Cela correspond à la séparation des chromosomes en deux noyaux distincts. Ce processus est accompagné de la cytokinèse, c'est-à-dire la division de la cellule en deux cellules filles.

Différents types de régulation et exemples

Il s'agit à présent de comprendre comment ce cycle cellulaire peut être contrôlé. Des études à l'échelle des cellules individuelles ont permis de détecter la présence ou non d'un tel contrôle, en observant l'effet d'une variation de taille initiale. Différents types cellulaires ont ainsi été étudiés afin de comprendre leur stratégie de régulation. Plusieurs types de mécanismes ont été décrits et sont récapitulés ici [207].

Pour distinguer ces différents modes de régulation, il est nécessaire de mesurer la taille initiale des cellules à la naissance que l'on appellera V_i ainsi que leur taille finale V_f, par exemple juste avant la division suivante. Ainsi on peut tracer cette taille finale V_f en fonction de la taille initiale V_i. De façon équivalente, c'est parfois la différence de taille entre la cellule à la naissance et à la division, c'est-à-dire $\Delta V = V_f - V_i$ qui est représentée. Les pentes de ces graphes fournissent alors des informations sur le mécanisme de régulation. Les 3 principales configurations identifiées sont représentées sur la figure 5.2 où V_f est représenté en fonction de V_i.

Une première possibilité consiste pour la cellule à déclencher l'étape suivante du cycle lorsqu'elle atteint une certaine taille. C'est alors ce qu'on appelle un *sizer*. Cela signifie que le volume

final V_f est une constante, comme indiqué sur la figure 5.2. Un *timer* quant à lui croît pendant une durée spécifique avant de déclencher le changement de phase du cycle. Ce mécanisme est alors indépendant de la taille de la cellule. Si l'on considère une croissance exponentielle, les plus grandes cellules devraient croître plus que de petites cellules en un temps donné. Cela donne donc une pente supérieure à 1 sur le graphique 5.2. En supposant une croissance exponentielle qui double la taille de la cellule à chaque cycle, la pente est alors de +2. Enfin, la notion d'*adder* a été introduite plus récemment. Dans ce cas, la cellule ajoute un volume fixe ΔV au volume initial donc $V_f = V_i + \text{constante}$, ce qui correspond à une pente égale à 1 sur ce graphe.

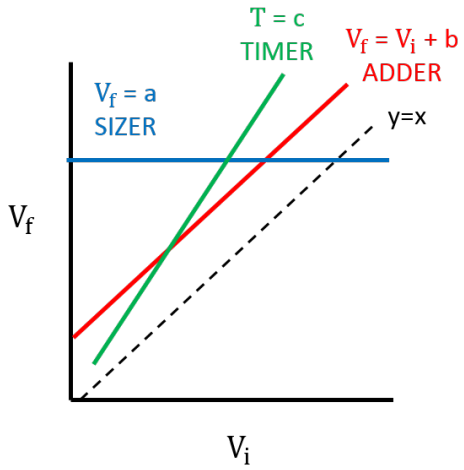


FIGURE 5.2 – Modèles de contrôle de la taille de cellules : *sizer*, *timer* ou *adder*. Ces mécanismes adoptent des pentes différentes lorsque l'on trace la taille finale V_f en fonction de la taille initiale V_i

Il est important de noter que ces pentes correspondent à des situations de régulation de type *sizer*, *timer* ou *adder* parfaits. Par conséquent, on peut trouver de nombreux exemples de cellules présentant des pentes intermédiaires qui ont donc une régulation imparfaite ou qui peuvent aussi utiliser une combinaison de ces mécanismes.

L'objectif d'un tel contrôle du cycle cellulaire est souvent de parvenir à l'homéostasie, c'est-à-dire de maintenir une taille de cellule à peu près constante au fur et à mesure des cycles. Si la taille est régulée, une cellule ayant un faible volume initial devrait croître plus longtemps qu'une grande cellule avant de se diviser. Ainsi, le mode du *sizer* permet d'atteindre immédiatement la taille optimale. Au contraire, un pur *timer* ne pourrait pas maintenir une taille stable, et propagerait d'éventuelles perturbations aux cycles suivants.

La bactérie *E. coli* semble maintenir par exemple sa taille constante grâce au mécanisme d'*adder* [208]. Ainsi la cellule ajoute toujours le même volume ΔV avant de se diviser au centre, ce qui fait converger la taille des cellules vers ce volume ΔV, comme le montre la figure 5.3. Les fluctuations du volume initial des cellules devraient donc se dissiper après quelques cycles cellulaires pour atteindre à nouveau la taille moyenne.

Précisons également que des points de contrôle peuvent être présents à divers moments du cycle cellulaire. Cela signifie que chaque phase peut avoir un type de régulation différent, prenant

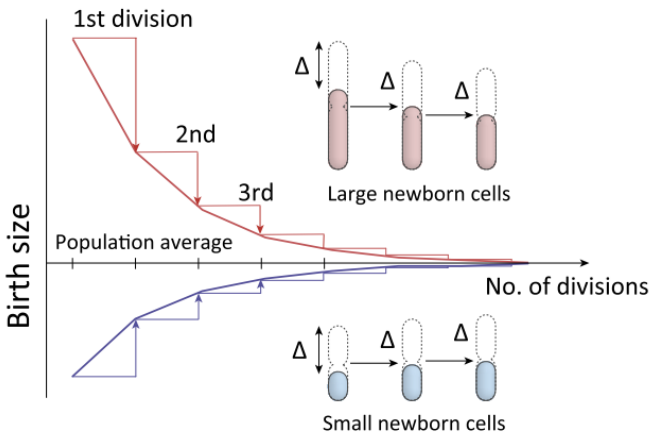


FIGURE 5.3 – Exemple du maintien d'une taille stable par le mécanisme d'*adder* adopté par la bactérie *E. coli* : des cellules à grand ou faible volume à la naissance convergent vers une taille moyenne après plusieurs cycles cellulaires [208]

part en proportion différente à la régulation globale du cycle.

On peut prendre l'exemple des levures dont le cycle cellulaire a été largement étudié. Les *fission yeasts* (*S. pombe*) et les *budding yeasts* (*S. cerevisiae*) ont des modes de croissance très différents puisque les premières croissent linéairement, tandis que les secondes ont une croissance exponentielle. Elles utilisent toutes deux des mécanismes de contrôle de leur taille, mais qui interviennent à différents moments du cycle cellulaire [209], comme le montre la figure 5.4. D'une part, les cellules de *S. cerevisiae* naissent avec des tailles variables, mais passent plus ou moins de temps en phase G1 de façon à avoir une taille contrôlée pour enclencher la réplication de l'ADN. Au contraire, dans le cas de *S. pombe*, les cellules entrent en phase G2 avec différentes tailles, mais entrent en mitose seulement lorsqu'elles atteignent une taille critique. On voit sur la figure 5.4 que la position différente du point de contrôle entre ces deux cycles entraîne de grandes variations au niveau de la répartition des phases. Ainsi la phase G1 est prépondérante chez *S. cerevisae*, tandis qu'elle est quasi-inexsitante chez la levure à fission pour laquelle G2 représente la majeure partie du cycle.

Plusieurs études ont cherché à déterminer plus précisément la façon dont *S. cerevisiae* régule son cycle cellulaire [210] [211]. En phase G1, ces levures présenteraient un mécanisme de type *adder*, avec toutefois une tendance plus proche d'un *sizer* pour des faibles volumes initiaux. La figure 5.5b représente le volume à la fin de la phase G1 en fonction du volume à la naissance et montre bien ce changement de comportement. Au contraire, la durée de la seconde partie du cycle (composée des phases S, G2 et M) serait indépendante de la taille de la cellule. Cette seconde étape serait donc considérée comme un *timer*, qui pourrait par exemple venir d'un temps minimal nécessaire à la cellule pour effectuer certaines tâches comme la réplication de l'ADN ou la mitose.

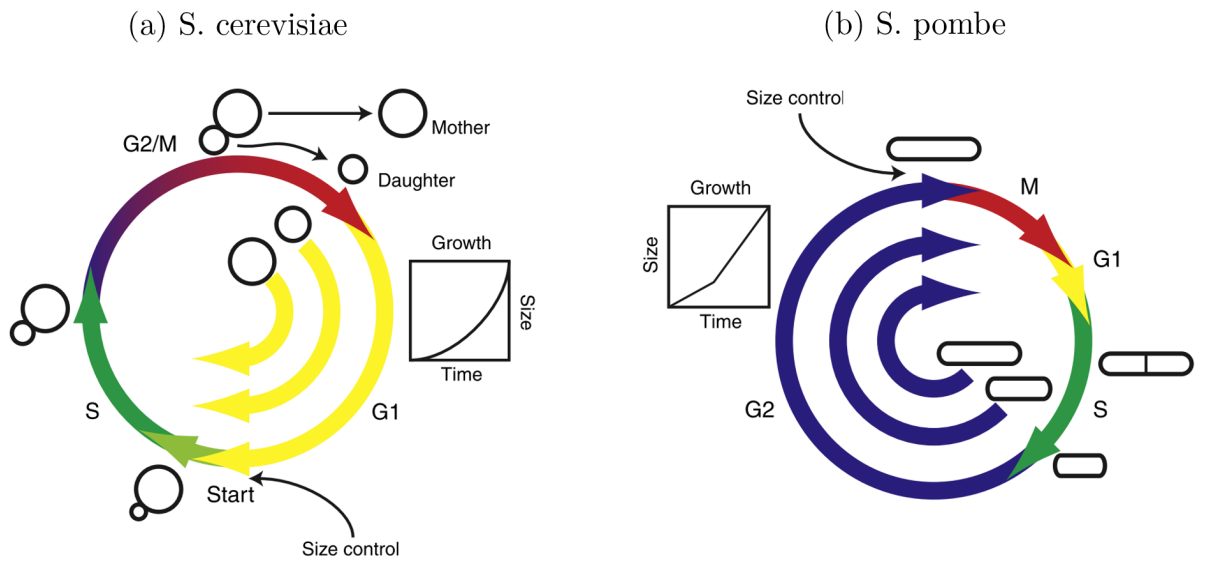


FIGURE 5.4 – Comparaison des cycles cellulaires de *S. cerevisiae* et de *S. pombe*, avec la répartition globale des différentes phases [209]. Le premier effectue un contrôle en taille à la fin de G1 et passe plus de temps dans cette phase, tandis que le second est principalement contrôlé en phase G2.

Mécanismes de régulation

De nombreux modèles ont été proposés pour expliquer comment les cellules parviennent à surveiller leur taille de façon à déclencher au bon moment la phase suivante du cycle cellulaire. Cela requiert la présence d'un signal biochimique, comme par exemple la concentration d'une protéine, qui dépend de la taille de la cellule. Dans ce cas, sa quantité serait fixe et n'augmenterait pas proportionnellement avec la taille de la cellule, contrairement à la plupart des protéines.

Un des mécanismes de régulation suggéré pour les *sizers* comme les levures repose sur la dilution d'un inhibiteur [212]. Chez *S. cerevisiae*, c'est la protéine Whi5 qui joue ce rôle. Cette protéine est synthétisée uniquement pendant les phases S/G2/M, et non pas pendant la phase G1 pendant laquelle la quantité reste la même. L'augmentation de la taille de la cellule réduit alors la concentration de Whi5 [213]. Lorsque la cellule est suffisamment grande, la concentration de Whi5 passe alors en dessous d'un seuil, ce qui déclencherait la transition G1/S car Whi5 en est un inhibiteur.

Un mécanisme plus complet de titrage permettant d'expliquer plusieurs types de régulation a été établi récemment [214] [215]. Le principe, représenté sur la figure 5.5a, est le suivant. Pour *S. cerevisiae*, l'inhibiteur est la protéine Whi5 comme mentionné précédemment, dont la concentration diminue quand la cellule grossit. La cycline Cln3 est un activateur qui est produit dans le cytosol pendant la phase G1 à un taux proportionnel au volume de la cellule, qui maintient donc une concentration constante. La transition entre les phases du cycle serait déclenchée quand la concentration de l'inhibiteur Whi5 passe en dessous du seuil fixé par la concentration de l'activateur Cln3.

À noter que ce modèle s'intéresse uniquement à la phase G1 du cycle cellulaire car la régu-

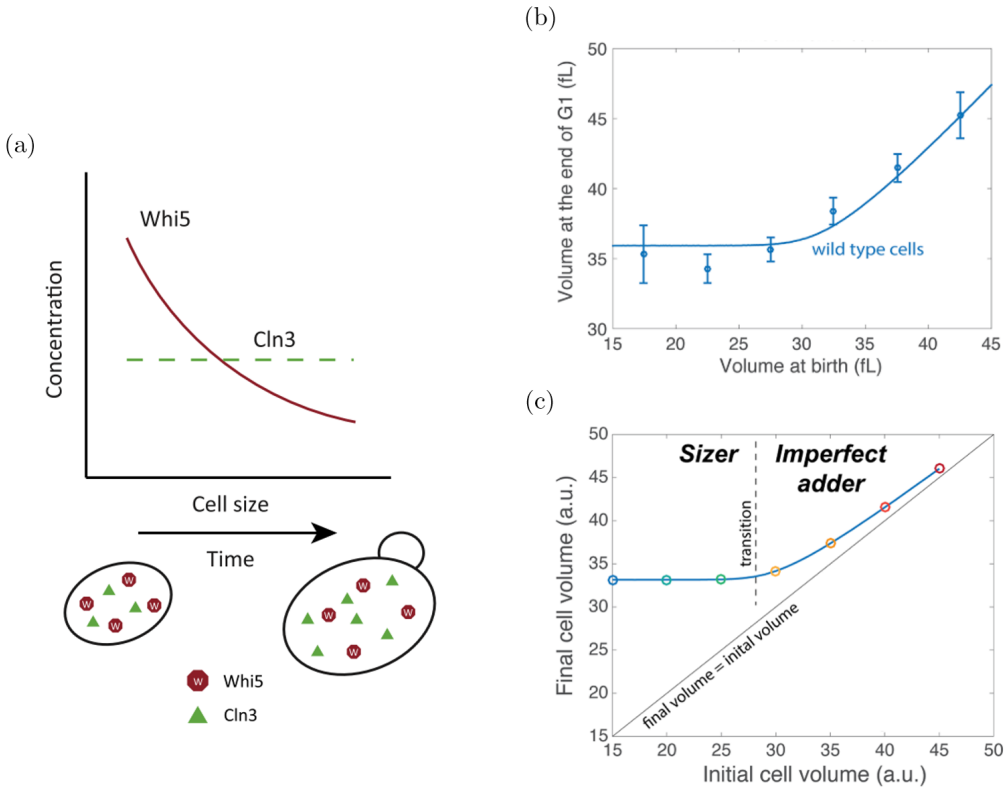


FIGURE 5.5 – Modèle expliquant le contrôle de la taille via la titration de molécules inhibitrices et activatrices ayant des concentrations dépendant différemment de la taille de la cellule [215]. (a) Principe du modèle de titration [214]. Comparaison entre les données expérimentales (b) et le modèle de titration (c) [215]. Ce modèle s'intéresse ici uniquement à la régulation de la phase G1 (le volume final correspond donc au volume à la fin de G1). Ce mécanisme moléculaire permet d'expliquer les deux régimes différents observés chez *S. cerevisiae* (sizer et adder).

lation de la taille pour ces levures s'effectue essentiellement lors de cette étape. Il n'est donc pas nécessairement pertinent d'essayer d'établir un modèle englobant l'ensemble du cycle cellulaire. Comme le montre la figure 5.5c, ce modèle est en bonne adéquation avec les données expérimentales puisqu'il retrouve les deux régimes : sizer à faible volume initial et adder à grand volume. Un seul mécanisme permettrait donc d'expliquer différents modes de régulation.

5.1.2 Cycle cellulaire chez *C. albicans*

Maintenant que nous avons établi rapidement un cadre pour l'étude des cycles cellulaires, nous souhaitons analyser plus particulièrement celui de *C. albicans*.

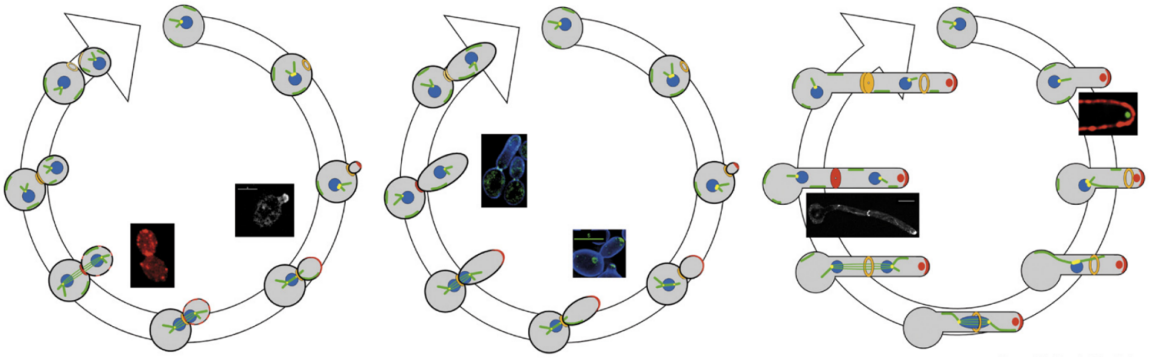
La progression du cycle chez *C. albicans* est à différencier de celle d'autres champignons filamenteux comme *Aspergillus* par exemple. En effet, ces derniers possèdent plusieurs noyaux par compartiment, ce qui donne lieu à un ensemble d'observations qui ne sont donc pas pertinents pour notre étude [216].

Régulations du cycle cellulaire

La littérature sur la question de la régulation du cycle cellulaire et de la taille des cellules pour les levures citées ci-dessus ou les bactéries est très abondante, et nous ne nous y attarderons pas plus ici. Mais il n'existe à notre connaissance aucune information précise concernant *C. albicans*, et en particulier une quelconque régulation de la taille des articles, compartiments cellulaires des champignons filamenteux. Plusieurs études déjà citées dans le chapitre 1 proposent une corrélation entre le volume des vacuoles et le cycle cellulaire [53], et suggèrent ainsi la nécessité pour un article d'atteindre un volume seuil de cytoplasme avant de pouvoir déclencher la phase S du cycle. Cela semble indiquer que la phase de croissance G1 aurait un mécanisme de type *sizer*, mais aucune étude ne vient étayer ce propos.

Dynamique du cycle cellulaire

Nous allons maintenant nous intéresser à la série d'évènements se produisant au cours d'un cycle cellulaire. Celui des levures et pseudo-hyphes de *C. albicans* est assez similaire à celui des levures de *S. cerevisiae*, mais diffère de celui des hyphes. Les cycles cellulaires pour ces différents morphotypes sont représentés en figure 5.6.



(a) levures (b) pseudo-hyphes (c) hyphes

FIGURE 5.6 – Progression du cycle cellulaire pour différents morphotypes de *C. albicans* selon Berman et al. 2006 [217]. Il y est décrit la formation d'un septum (anneau jaune) au niveau de la constriction avec le futur bourgeon pour les levures et pseudo-hyphes, et dans le tube germinatif pour les hyphes. Le noyau se divise au niveau du septum dans chacun de ces cas (mais cette affirmation sera contredite pour les hyphes dans des études ultérieures). Enfin les deux cellules se séparent dans le cas des levures.

À sa naissance, la levure croît en phase G1 et un anneau de septine se forme. L'émergence d'un bourgeon à cet endroit initie alors la transition entre la phase G1 et la phase S (aussi appelée START) et s'accompagne du début de la réplication de l'ADN. On observe également la duplication du *spindle pole body*, équivalent du centrosome qui est le centre organisateur des microtubules, et joue un rôle important dans la division cellulaire. Le noyau se divise ensuite au niveau du septum, c'est-à-dire au niveau de la constriction entre les deux cellules. Dans le cas des levures, ces deux cellules indépendantes se séparent alors que la cellule-fille a encore une taille inférieure à celle de la cellule-mère.

Le cycle chez les pseudo-hyphes se déroule globalement de la même façon : le septum est également formé au niveau de la constriction avec le bourgeon et la mitose se déroule à cet endroit. Deux différences importantes sont tout de même à noter : la croissance des pseudo-hyphes est polarisée et elles passent plus de temps en phase G2, de plus les cellules restent attachées après la cytokinèse.

Rappelons que les hyphes sont constituées de compartiments séparés par des septums, mais sans aucune constriction et chacun de ces articles contient un seul noyau. Nous avons vu que l'émergence d'un bourgeon est précédée de la formation d'un septum et est corrélée au cycle cellulaire. Au contraire, la formation d'un tube germinatif à partir de la levure se fait sans formation de septum préalable. Il a ainsi été suggéré que le processus d'élongation hyphale serait régulé indépendamment du cycle cellulaire [218]. Le tube germinatif croît tout d'abord jusqu'à l'apparition d'un septum, ou plutôt préseptum car il n'est pas encore complètement formé à ce stade. Les étapes représentatives des cycles ultérieurs de croissance de l'hyphe sont représentées en figure 5.7. Le noyau se divise au sein de l'article (entre un septum formé et le septum en cours de formation) [219] alors que cette division avait d'abord été décrite au niveau de ce préseptum, de façon similaire aux levures [113]. L'un des noyaux reste dans cet article, tandis que le second se déplace le long de l'hyphe, traverse le préseptum (qui marque le futur site de septation) pour atteindre le compartiment suivant. La dynamique des noyaux, qui se déplacent donc sur de longues distances dans cette forme filamenteuse, a été plus précisément étudiée [113]. Les auteurs ont pu corréler les mouvements de microtubules à ces déplacements de noyaux, montrant ainsi que le mécanisme de migration du noyau-fille vers l'apex correspondrait au glissement des microtubules, tandis que celui du noyau-mère, qui au contraire retourne vers l'arrière après division, serait lié à leur élongation. Ainsi, le cycle cellulaire implique non seulement la formation des septums et le déplacement des noyaux mais la forme des microtubules fluctue également au cours du cycle. Nous reviendrons plus précisément sur le déroulé du cycle et ses principales étapes dans la suite de ce chapitre.

5.2 Etude du cycle cellulaire dans la forme hyphale de *C. albicans*

L'étude bibliographique présentée ci-dessus montre que l'évolution du cycle cellulaire de la forme hyphale et sa régulation ont été assez peu étudiées pour le moment. De plus, les quelques travaux ayant commencé à aborder ce sujet ne permettent pas une étude systématique sur un grand nombre de cellules. Nous proposons ici d'utiliser les méthodes développées en microfluidique pour l'étude de la croissance hyphale. La parallélisation des microcanaux et l'optimisation de notre puce microfluidique vont permettre l'acquisition d'une grande quantité de données afin de mieux comprendre la régulation du cycle cellulaire des hyphes.

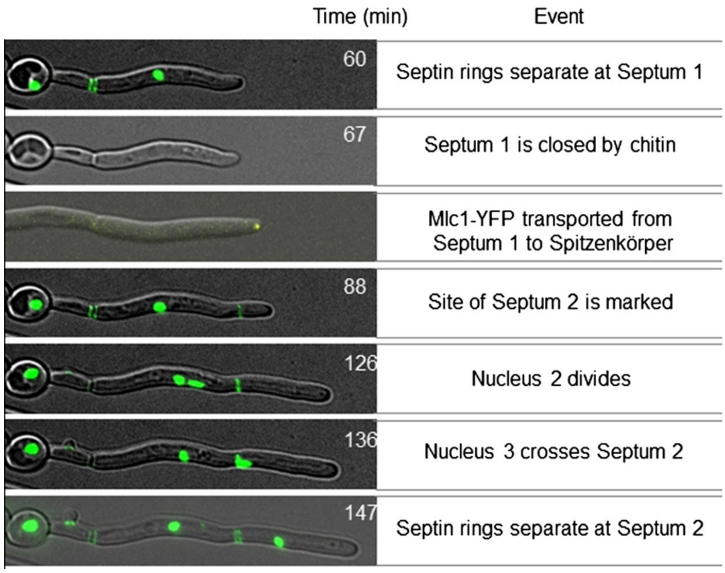


FIGURE 5.7 – Visualisation de la séquence d'évènements du cycle cellulaire des hyphes chez *C. albicans*, grâce à un marquage du noyau (Nop1-YFP) et du septum (Cdc3-GFP) [219]. Le septum apparaît dès que l'apex passe à cette position, puis le noyau se divise dans l'article précédent. Le second noyau migre et traverse le septum pour atteindre le compartiment suivant. On observe ensuite que les deux anneaux de septine se séparent.

5.2.1 Puces et souches utilisées

Des puces similaires à celles qui ont été présentées dans les chapitres précédents ont été utilisées. Elles contiennent des canaux rectilignes de 150 µm de long, et d'environ 2 µm en largeur et hauteur. L'ensemencement des puces se fait en suivant le protocole décrit au chapitre 2.

Pour suivre les différentes étapes du cycle cellulaire, il est nécessaire de pouvoir repérer le noyau ainsi que le septum. La souche Nop1-YFP/Cdc3-GFP est donc particulièrement adaptée pour cette étude. Étant donné l'organisation spatiale très différente de ces deux composants de la cellule, les deux protéines fluorescentes peuvent facilement être visualisées sur le même canal de fluorescence GFP. Des time-lapses sont ensuite réalisés en faisant des acquisitions d'images en champ clair ainsi qu'en fluorescence à intervalles de temps réguliers.

5.2.2 Analyse d'images

L'utilisation de canaux rectilignes de la taille des hyphes facilitent grandement l'analyse d'images, qui sera effectuée avec Fiji et Matlab. On peut ainsi réaliser un kymographe, qui est une façon de représenter en une seule image un processus dynamique comme la croissance hyphale. Un montage de ce type est représenté sur la figure 5.8. L'abscisse donne la position le long du canal, tandis que l'ordonnée représente le temps, ce qui signifie que chaque ligne correspond à un instant t.

Un kymographe permet donc de rendre compte de l'avancée de l'hyphe dans le canal, ainsi que de la position des noyaux et des septums. Le marquage des septums a une intensité relativement faible par rapport aux noyaux, et ils ne sont pas toujours faciles à distinguer sur toutes les

images. Cependant, les hyphes ont une croissance apicale et ne se déplacent pas. Ainsi, comme on le voit sur le kymographe 5.8, les septums ont une position fixe.

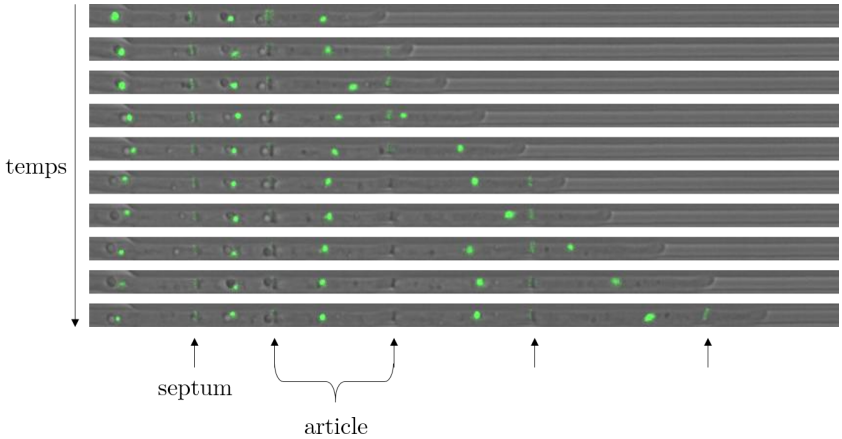


FIGURE 5.8 – Exemple de kymographe obtenu pour la croissance de la souche Nop1-YPF/Cdc3-GFP. On distingue très bien les noyaux, et plus faiblement les septums qui constituent les séparations entre les articles.

Au-delà de l'aspect visuel très pratique du kymographe, il permet également d'effectuer l'intégralité de l'analyse sur une seule image au lieu d'une séquence d'images.

Avancée de l'hyphe

A partir de ces kymographes, comme celui de la figure 5.9a, on peut extraire la position de l'apex du filament, représenté sur l'image b. Celle-ci peut être obtenue facilement et de façon automatisée si l'exclusion de fluorescence est utilisée pour l'expérience. Mais dans ce cas, il faut alors ajouter du dextran fluorescent dans le milieu, ce qui rajoute un canal d'illumination de fluorescence. Au contraire, on cherche plutôt à réduire au maximum l'exposition des champignons afin de pouvoir les observer sur de longues durées. On se contentera donc d'analyser les images en champ clair et dans le canal GFP, même si des ajustements manuels sont nécessaires.

Suivi des noyaux

Dans un premier temps, il nous faut repérer les noyaux individuellement et déterminer leur position. L'abscisse nous donne alors leur position dans le canal, tandis que l'ordonnée du kymographe fournit le temps t.

On notera également que l'on s'intéresse uniquement aux régions apicales, c'est-à-dire proche de l'apex de l'hyphe. En effet, en amont, des branches peuvent apparaître ce qui rend l'analyse impossible due à la superposition des hyphes dans les canaux, comme on peut le constater dans la zone en bas à gauche de la figure 5.9a. Avant de poursuivre l'analyse, il est donc nécessaire de retirer manuellement cette zone, comme sur l'image c.

La fonction *analyse particles* de Fiji est ensuite utilisée sur le canal fluorescent afin de détecter les noyaux. Les paramètres sont réglés de façon à détecter des objets de taille proche de celle

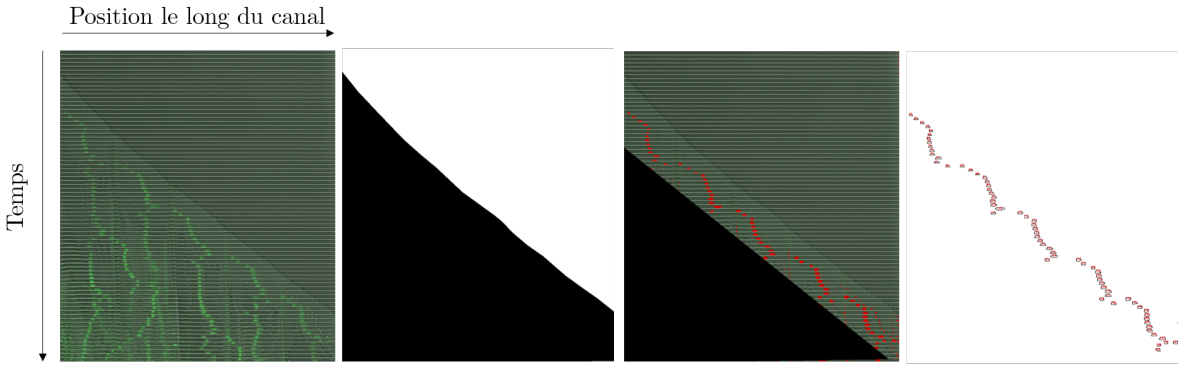


FIGURE 5.9 – Analyse d'images utilisée pour repérer la position de l'apex et des noyaux au cours du temps. (a) Kymographe obtenu à partir d'une séquence d'images de la progression d'une hyphe dans un microcanal. Les noyaux se distinguent très facilement en vert, ainsi que les septums qui sont toutefois plus faiblement marqués. (b) Masque correspondant à la progression de l'hyphe dans le canal. (c) Les superpositions de plusieurs branches sont enlevées en conservant uniquement la zone la plus proche de l'apex. (d) Un seuillage est d'abord effectué, puis la fonction *analyse particles* de Fiji repère spécifiquement les noyaux, éliminant les objets de taille aberrante.

attendue pour les noyaux, en évitant de prendre en compte les septums ou de petits artefacts par exemple. Chaque noyau est alors identifié et sa position est enregistrée.

Extraction des données

A partir de l'intervalle de temps dt entre chaque image et de l'échelle, un programme Matlab extrait ensuite ces données pour tracer un graphe comme représenté en figure 5.10. La position de l'apex et des noyaux est tracée en fonction du temps, et la position des septums est également repérée.

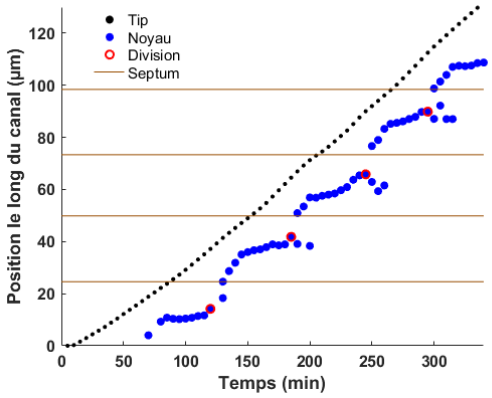


FIGURE 5.10 – Graphe représentatif montrant les différentes données extraites du kymographe de la figure 5.9. La position de l'apex de l'hyphe (en noir) ainsi que celle des noyaux (en bleu) sont représentées en fonction du temps. La position des septums est indiqué par les traits oranges, et le noyau juste avant sa division est entouré en rouge.

De nombreux paramètres peuvent ensuite être déduits de ce graphe. En particulier, on définit

le moment de la division du noyau comme l'instant t où un seul noyau est présent tandis que deux noyaux sont détectés à l'instant $t + dt$. Sa position est alors également obtenue et entourée en rouge sur la figure 5.10. On peut aussi déterminer l'instant de formation des septums ou encore la taille des articles, c'est-à-dire la distance entre chaque septum, mais aussi la distance entre le noyau et l'apex ou les vitesses de croissance et de déplacement du noyau.

L'extraction automatisée de ces divers paramètres va nous permettre d'apporter un éclairage sur le fonctionnement du cycle cellulaire des hyphes.

5.3 Description des différentes étapes du cycle cellulaire chez *C. albicans*

Commençons par définir précisément les différentes étapes du cycle cellulaire auxquelles on va s'intéresser. Les divers événements se déroulant au cours d'un cycle sont représentés sur la figure 5.11 pour les hyphes ainsi que pour les levures. Le cycle cellulaire des levures, en particulier celui de *S. cerevisiae* étant largement étudié dans la littérature, on s'appuiera sur les notions et les étapes clés définis pour les levures afin de les comparer à ceux des hyphes, ici chez *C. albicans*. Des images représentatives pour les hyphes et les levures sont également présentées sur la figure 5.12.

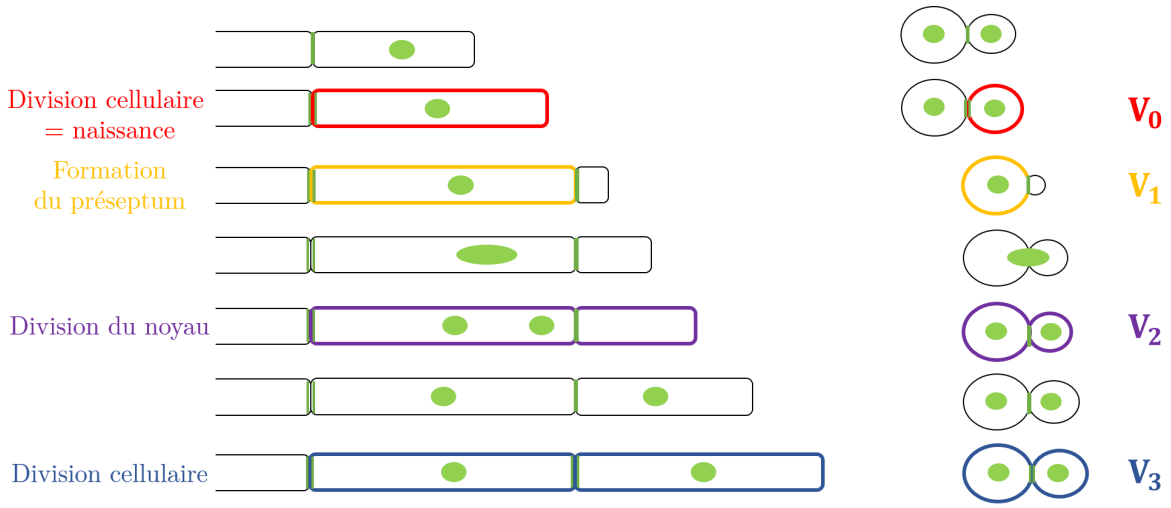


FIGURE 5.11 – Représentation schématique de la progression du cycle cellulaire chez les hyphes ainsi que les levures de *C. albicans*. Différentes étapes du cycle facilement repérables ont été distinguées, et les volumes à chaque étape sont également identifiés.

5.3.1 Naissance

Tout d'abord, le volume à la naissance des levures est définie comme le volume à l'instant où la cellule-fille se sépare de la cellule-mère. Il est indiqué en rouge sur la figure 5.11 et noté V_0. Cette naissance est très facile à repérer pour les levures, mais rappelons que pour les hyphes, il n'y a pas de séparation des cellules à proprement parler : les articles, même s'ils constituent des

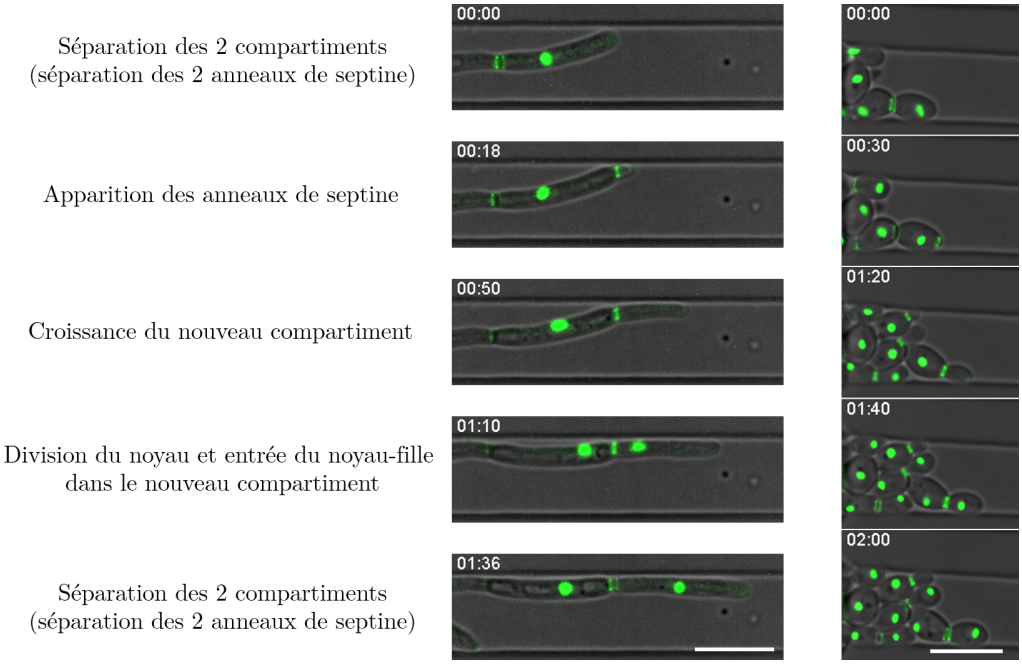


FIGURE 5.12 – Images de la souche Nop1-YPF/Cdc3-GFP représentant les différents événements caractéristiques du cycle cellulaire, en cas de croissance hyphale ainsi que pour la croissance de levures, dans des microcanaux de largeur 10 µm et hauteur 3 µm. Barre d'échelle = 10 µm.

entités relativement indépendantes possédant chacun leur noyau, restent attachés. Cependant, cette cytokinèse est associée à la séparation des deux anneaux de septine localisés entre les deux cellules. La souche que nous utilisons avec un marquage fluorescent de Cdc3 nous permet de distinguer cette séparation des anneaux, pour les levures comme pour les hyphes, que l'on observe bien sur les images de la figure 5.12. Celle-ci, visible grâce à la fluorescence, s'accompagne de la formation d'une paroi en chitine, cette fois visible en microscopie en champ clair.

5.3.2 De la naissance à l'apparition du préseptum

La levure croît ensuite en phase G1 jusqu'à l'apparition des anneaux de septine, qui est suivi du bourgeonnement. Il a été montré pour la levure que le début du bourgeonnement correspond au début de la phase S, c'est-à-dire au début de la réplication de l'ADN [218]. De la même façon que pour les levures, on peut repérer la formation du nouveau préseptum lors de la croissance hyphale. À un instant donné, les anneaux de septine apparaissent à l'apex (et non en amont de l'apex) et restent à cette position alors que le filament poursuit sa croissance. On ne peut toutefois pas affirmer pour le moment que l'apparition du préseptum marque également le début de la réplication d'ADN et donc la transition entre G1 et S pour les hyphes. Le volume à apparition du préseptum, qui correspond en fait à la taille totale de l'article, est noté V_1 (représenté en jaune sur la figure 5.11).

En réalité, on constate que les étapes 0 et 1 se produisent quasiment au même moment pour les hyphes : l'article est d'abord séparé de son article-mère en amont et forme son nouveau préseptum seulement quelques minutes plus tard. L'intervalle de temps entre nos images est

généralement de 5 minutes et ne nous permet donc pas de déterminer cette durée plus précisément. Dans les rares cas où la durée entre ces deux événements est importante, la croissance est alors particulièrement lente, résultant en des volumes V_0 et V_1 tout de même très proches. Si l'on s'appuie sur les définitions des phases telles que décrites pour les levures de *S. cerevisae*, cela reviendrait à avoir une phase G1 quasi-inexistante.

5.3.3 De l'apparition du préseptum à la division du noyau

Cette étape correspond à priori aux phases S, G2 et M, qui sont particulièrement difficiles à distinguer. Le volume au moment de la séparation des deux noyaux, noté V_2, est représenté en violet sur la figure 5.11.

Après la formation du préseptum, l'hyphe poursuit sa croissance tandis que le noyau se déplace également vers l'apex. Un zoom sur une portion de la figure 5.10 est représenté en figure 5.13b afin de s'intéresser plus précisément à ce qu'il se passe durant cette phase, qui est encadrée en rouge. On remarque ici que le noyau semble centré entre le septum précédent (en orange) et l'apex de l'hyphe (en noir).

Cette observation est cohérente avec le fait que la vitesse moyenne de déplacement du noyau est deux fois plus petite que celle de la progression de l'apex (figure 5.13a). De plus, on peut tracer la variation de la position du noyau par rapport au centre entre le septum et l'apex à chaque instant au cours de cette phase. Cela est représenté en figure 5.13c avec dx qui correspond à $\mathrm{x}_{\mathrm{noyau}} - \mathrm{x}_{\mathrm{centre(septum-apex)}}$ normalisé par la distance entre le septum et l'apex de façon à ce que la valeur de 1 corresponde à la position de l'apex et -1 celle du septum. Le temps est également normalisé pour superposer plusieurs courbes entre le moment de l'apparition des anneaux de septine et de division du noyau.

On voit donc que le noyau est légèrement décalé du côté du septum, tout en se maintenant assez proche de cette position centrale. C'est le cas en particulier au moment où les deux noyaux se séparent, et cela nous donne donc la localisation du noyau au moment de sa division. Comme décrit en introduction, des affirmations contradictoires peuvent être trouvées dans la littérature concernant cette position. Dans un premier temps, il était admis que la division s'effectuait au niveau du préseptum, comme c'est le cas pour les levures [113]. Plus récemment, une étude a montré que pour les hyphes, le noyau ne se divisait pas au préseptum mais bien au sein de l'article [219]. Nos expériences ont confirmé cette observation : on voit à de nombreuses reprises deux noyaux dans le premier compartiment, et c'est seulement ensuite qu'ils se déplacent, comme sur l'exemple en figure 5.13b. On montre ici que la division s'effectue en réalité entre le septum précédent et l'apex, position qui est, dans la plupart des cas, différente de la position du futur septum.

La position centrale des noyaux ainsi que le déplacement particulièrement rapide du noyau-fille après division suggèrent la présence de forces développées pour tirer ou pousser ces noyaux. Les microtubules sont un excellent candidat pour cela et leur dynamique a déjà été comparée à celle des noyaux pour les hyphes de *C. albicans* [113]. La figure 5.14 montre une séquence d'images de la souche marquée pour les microtubules (Tub2-GFP). On y voit le fuseau mitotique constitué

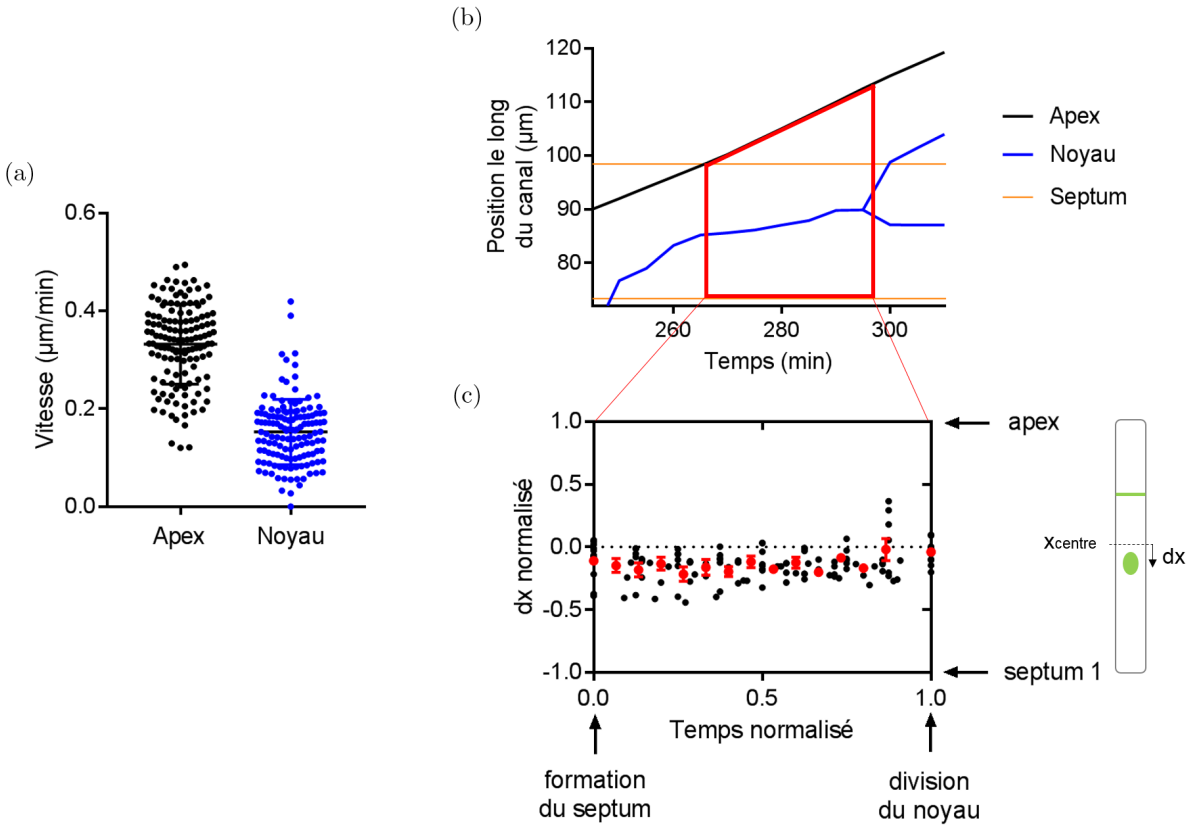


FIGURE 5.13 – Description de la dynamique du noyau (avant division) durant la 2ème phase (entre l'apparition du préseptum et la division du noyau). (a) Comparaison de la vitesse moyenne de croissance à l'apex de l'hyphe et la vitesse moyenne de déplacement du noyau pendant cette phase (n=136). (b) Portion de la courbe représentée pour l'exemple représentatif de la figure 5.10 focalisée sur un seul cycle. La position de l'apex et du noyau est représentée en fonction du temps. La phase qui nous intéresse ici est encadrée en rouge. (c) Mesure de la position du noyau relative au centre entre le septum précédent et l'apex $dx = 2(x_{noyau} - x_{centre(septum-apex)})/D_{septum-apex}$ en fonction du temps normalisé entre l'apparition du préseptum et la division du noyau. Plusieurs courbes sont superposées (n=14) et les données binnées, c'est-à-dire regroupées par classe, sont indiquées en rouge. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type de la moyenne.

de microtubules, caractéristique de la phase de réplication d'ADN, jusqu'à sa séparation (à t=120min) qui correspond donc à la séparation des noyaux. La dernière image est quant à elle caractéristique d'une phase G1.

Malheureusement, la souche Tub2-GFP que nous avons utilisée semble avoir un phénotype assez différent des autres souches, notamment avec des articles de taille nettement plus grande. Il est donc assez difficile de comparer les événements sur cette souche avec la dynamique des noyaux et septums. Il semble tout de même sur les images de la figure 5.14 que ces microtubules sont reliés aux extrémités, d'une part du côté de la levure, et d'autre part au niveau de l'apex de l'hyphe. Cela nécessiterait bien sûr de nouvelles observations, mais si cela se confirme, ce serait en accord avec la position centrale de la division du noyau : d'un coté le septum qui le sépare de la cellule précédente et de l'autre l'apex (car le préseptum intermédiaire n'est pas encore

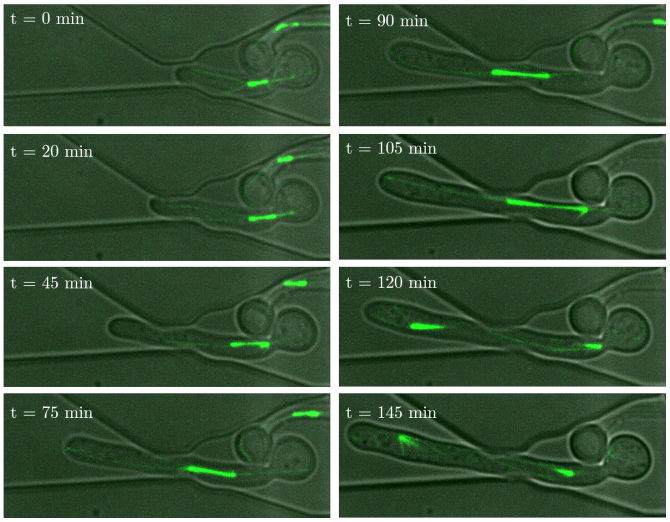


FIGURE 5.14 – Séquence d'images de croissance de la souche Tub2-GFP. Le signal fluorescent indique les microtubules dont on voit la formation du faisceau ainsi que sa séparation qui correspond à la séparation des noyaux.

complètement formé à ce moment).

5.3.4 De la division nucléaire à la division cellulaire

Après division, le noyau-mère se maintient dans son article et se déplace dans le sens opposé à la croissance pour revenir au centre de ce compartiment, comme décrit précédemment dans la littérature [113]. Le noyau-fille se déplace très rapidement vers l'apex et traverse d'abord le préseptum en cours de formation pour atteindre le nouvel article. Ce déplacement est indiqué dans la zone rouge de la figure 5.15a. Entre la division nucléaire et l'arrivée du noyau dans l'article suivant, la vitesse de déplacement du noyau est alors largement supérieure à la vitesse de croissance de l'hyphe (figure 5.15b), ce qui est probablement lié aux forces exercées par le cytosquelette.

Ensuite le noyau se déplace à peu près à la même vitesse que l'apex de l'hyphe jusqu'à la séparation des deux compartiments, comme le montre la zone verte de la figure 5.15a et la figure c. On peut donc se demander si cette différence de vitesse de déplacement du noyau serait liée à un changement de site d'accroche du noyau. Comme indiqué précédemment, on peut supposer que le noyau est initialement relié d'une part au septum précédent et d'autre part à l'apex. Lors de la séparation des noyaux, le noyau-fille pourrait alors être uniquement accroché à l'apex et se faire "tirer" de ce côté, jusqu'à son arrivée dans l'article suivant qui lui permettrait de trouver un nouveau point d'accroche au niveau du septum.

Enfin, le cycle complet se termine lorsqu'il y a séparation entre les deux articles ou levures. Cette étape coïncide avec la naissance de la cellule-fille et le volume final correspond alors à V_3, le volume total des deux cellules, indiqué en bleu sur la figure 5.11.

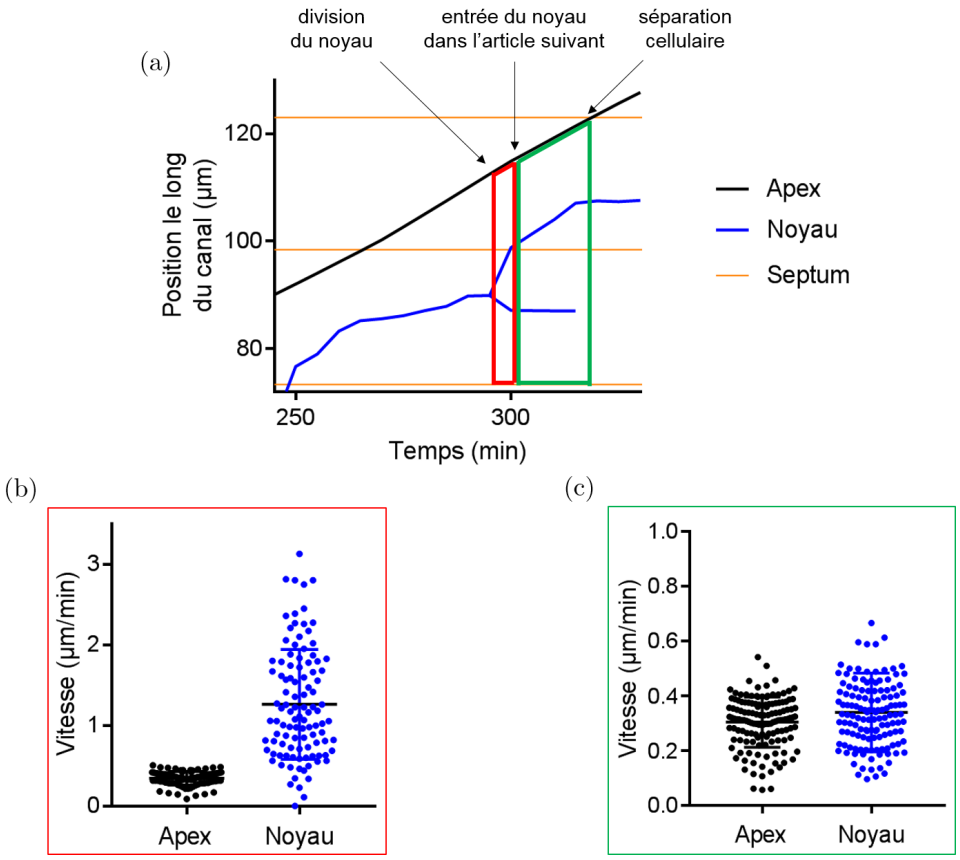


FIGURE 5.15 – Description de la dynamique du noyau durant la 3ème phase (entre la division du noyau et la division cellulaire). (a) Portion de la courbe représentée en figure 5.10 focalisée sur un seul cycle. La position de l'apex et du noyau est représentée en fonction du temps. On distingue ici deux parties : la première quand le noyau-fille se déplace dans l'article initial (rouge), et la seconde quand il est entré dans l'article suivant (vert). (b) (c) Comparaison de la vitesse moyenne de croissance à l'apex de l'hyphe et la vitesse moyenne de déplacement du noyau durant la première (b) (n=105) et la seconde (c) partie (n=134).

5.3.5 Formation de branchement

Les hyphes sont également capables de créer des branchements latéraux. Dans ce cas, le préseptum se forme sur le côté d'un article situé en amont de celui à l'apex. Ensuite, la séquence d'événements est la même que lorsque cela se produit à l'apex. On observe d'abord la croissance de l'hyphe juste après l'apparition des anneaux de septine, puis le noyau de l'article à partir duquel se forme la branche se divise. Le noyau-fille entre ensuite dans cette nouvelle branche et enfin les deux anneaux de septine se séparent.

5.4 Vitesse de croissance et cycle cellulaire

A partir des données extraites des kymographes et des graphes comme celui de la figure 5.10, on peut se demander s'il existe un lien entre la vitesse de croissance et le cycle cellulaire.

5.4.1 Vitesse de croissance par article

Outre les variations de vitesse de croissance entre les hyphes, on constate aussi dans de nombreux cas que la vitesse d'un seul filament peut légèrement varier au cours de sa croissance, comme c'est le cas sur la figure 5.10. Il est alors envisageable de considérer non pas la vitesse des filaments entiers, mais plutôt celle des cellules individuelles, c'est-à-dire des articles séparés par les septums. Celles-ci peuvent être considérées comme linéaires, même pour des cas extrêmes avec de très grandes variations de vitesse, comme sur la figure 5.16. Cet exemple, bien qu'isolé, nous servira à illustrer le propos de cette section.

On y voit que l'article représenté en vert est très court et la vitesse de croissance (c'est-à-dire la pente) pour cet article est très faible. Pour autant, cela ne revient tout de même pas à avoir une durée de formation d'article constante.

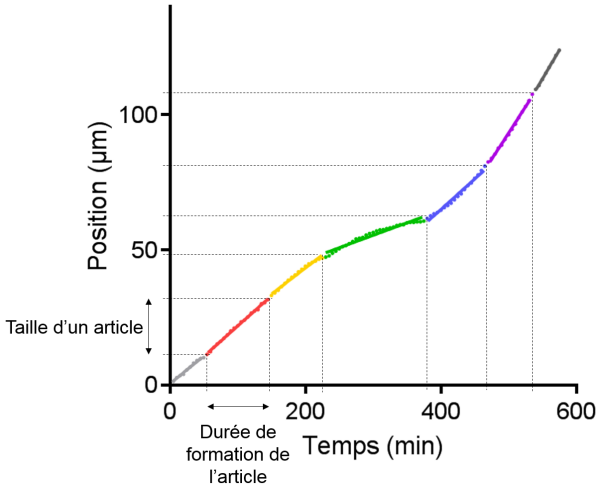


FIGURE 5.16 – Exemple de croissance d'une hyphe : position le long du canal en fonction du temps. Les articles successifs sont différenciés, et on observe les différences de vitesse de croissance.

On peut ainsi représenter la longueur d'un article en fonction de sa vitesse de croissance, comme le montre la figure 5.17a. On utilise ici les longueurs d'article ainsi que des vitesses de croissance en unité de longueur par unité de temps, au lieu de prendre en compte les volumes car les hyphes conservent globalement le même diamètre. On voit ici une nette corrélation entre ces deux paramètres : un article long est associé à une vitesse de croissance élevée, tandis qu'un article court croît avec une faible vitesse.

La droite représentée en figure 5.17a qui ajuste ces points a pour équation :

$$L_{article} = t_0 v_{article} + L_0 \tag{5.1}$$

avec $t_0 = 33$ min et $L_0 = 12.5\,\mu\text{m}$.

Le fait que le coefficient L_0 soit non nul signifie bien que cet effet n'est pas lié à un temps de formation de l'article constant, sinon on aurait simplement $L_{article} = t_{article} v_{article}$. On peut alors comprendre cette équation dans le sens où L_0 correspondrait à la longueur minimale que

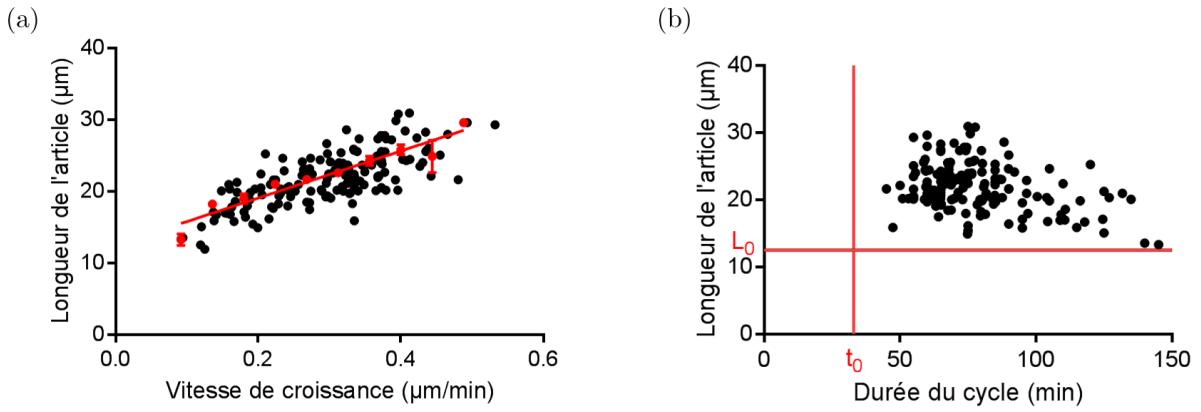


FIGURE 5.17 – (a) Corrélation entre la taille d'article $L_{article}$ et sa vitesse de croissance $v_{article}$ fournissant les paramètres de taille et de durée minimales pour la formation d'un article L_0 et t_0 (n=157). Les données binnées sont représentées en rouge. (b) Longueur d'article en fonction de sa durée de formation. Les valeurs L_0 et t_0 délimitent les points de longueur d'article en fonction de sa durée de formation.

l'article peut adopter, quelle que soit sa vitesse de croissance. Et t_0 serait le temps minimal de formation de cet article, donc le temps minimal nécessaire pour effectuer le cycle cellulaire complet.

En traçant $L_{article}$ en fonction de $t_{article}$ (figure 5.17b), on voit effectivement que ces deux paramètres L_0 et t_0 obtenus à partir de l'ajustement délimitent l'ensemble des points.

Ce type d'analyse a en réalité déjà été effectué pour les levures de *S. cerevisiae* [220]. Cette étude montre que le volume des levures au moment de l'apparition des anneaux de septine augmente avec la vitesse de croissance pendant la phase G1. De la même façon que pour notre situation, cela correspond à un temps et volume minimum.

Les auteurs parlent alors dans ce cas d'un *sizer* dépendant de la vitesse de croissance. Il s'agit de considérer que la vitesse de croissance est un paramètre variable, qui module le moment d'apparition du nouveau préseptum, c'est-à-dire la longueur de l'article. Ce type de régulation est comparé avec un modèle de *sizer* pur. Ce dernier entraîne de très grandes variations de durée de formation d'un article, car quelle que soit sa vitesse de croissance, le compartiment doit atteindre une taille donnée. Au contraire, si le volume final est une fonction croissante de la vitesse de croissance, alors des fluctuations de taille sont générées mais les fluctuations sur la durée du cycle sont quant à elles réduites. Outre la réduction des fluctuations de la durée du cycle, les auteurs de ces travaux ont également montré que ce mode de régulation serait en même temps suffisant pour maintenir l'homéostasie, c'est-à-dire d'éviter aussi de larges variations en terme de taille [220].

5.4.2 Vitesse de croissance par phase

Maintenant que nous avons étudié les variations de vitesse de croissance entre les articles, nous pouvons regarder ce qui se passe à l'échelle de temps inférieure, à savoir étudier les variations de vitesse au cours d'un cycle cellulaire. En effet, il a été montré pour *S. cerevisiae* que cette

vitesse de croissance n'était pas constante au cours des différentes étapes du cycle [220]. De nouvelles expériences avec un intervalle de temps plus court permettraient d'obtenir plus de précision, mais on peut déjà dégager certaines tendances. La vitesse de croissance instantanée de l'hyphe correspondant à la figure 5.10 est représentée en figure 5.18a. En ajoutant les moments où les préseptums apparaissent (en orange), il semble que la vitesse est minimale au moment de l'apparition de ces préseptums (qui coïncide, rappelons-le, avec la séparation des deux articles précédents). La figure 5.18b illustre le même propos en superposant des courbes redimensionnées de vitesses en fonction du temps. En d'autres termes, pour chaque article, on trace la vitesse normalisée autour de l'instant d'apparition du préseptum, qui correspond ici à l'abscisse 0,5. Les données binnées (en rouge) semblent confirmer cette tendance de vitesse instantanée plus faible lors de la formation du préseptum. Cette observation semble corrélée à celle faite pour les levures de *S. cerevisiae*, pour lesquelles la vitesse augmente après l'émergence du bourgeon, qui correspond à la formation du septum dans le cas des levures [220].

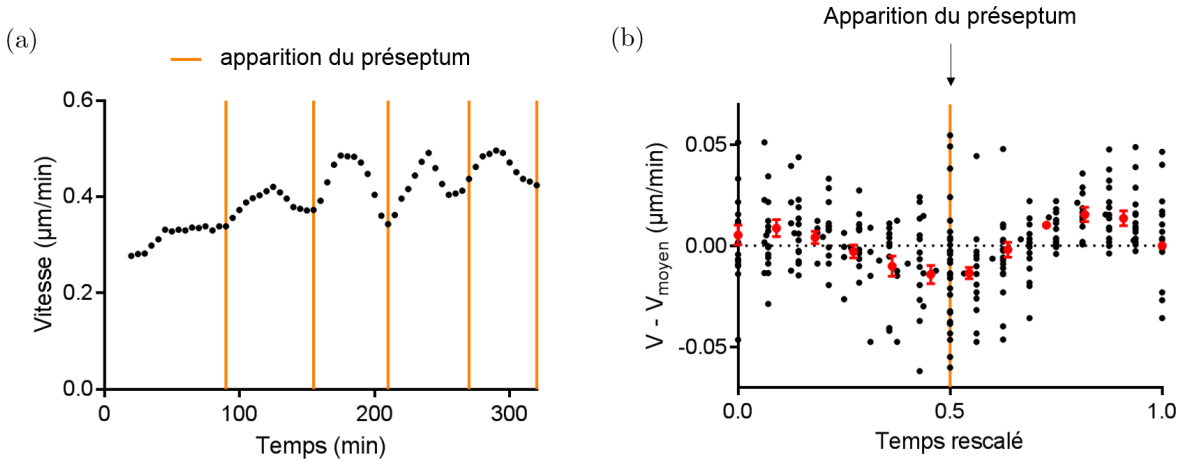


FIGURE 5.18 – Variation de vitesse au cours du cycle cellulaire. (a) Vitesse de croissance de l'hyphe correspondant à la figure 5.10 en fonction du temps. Les instants d'apparition des anneaux de septine sont également indiqués en orange. (b) Vitesse de croissance normalisée en fonction du temps redimensionné de façon à fixer l'apparition des préseptums à 0,5. Plusieurs courbes sont superposées (n=18) et les données binnées, c'est-à-dire regroupées par classe, sont indiquées en rouge. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type de la moyenne.

Il faut toutefois être prudent sur ce constat car on mesure à nouveau ici les longueurs des filaments et non leur volume. En particulier, lors de la croissance de pseudo-hyphes, la constriction au niveau du septum est bien visible et la vitesse mesurée juste après sa formation est surestimée car son diamètre n'est pas constant. Les données présentées ici concernent uniquement des hyphes ne présentant pas de constrictions visibles, et donc n'étant à priori pas sujets à cette surestimation. Mais des mesures en exclusion de fluorescence devraient tout de même être réalisées afin de vérifier qu'aucun biais n'a été introduit.

5.4.3 Vitesse de croissance globale

Enfin, si l'on s'intéresse à la croissance globale des hyphes, on remarque que généralement la vitesse augmente au fil de la croissance de l'hyphe dans les microcanaux, c'est-à-dire qu'un article a tendance à avoir une vitesse de croissance légèrement plus élevée que l'article précédent. Cette tendance est relativement faible sur l'exemple de la figure 5.10, mais tout de même présente comme le montre d'ailleurs le tracé de la vitesse instantanée sur la figure 5.18a où l'on voit que la vitesse augmente globalement (en dépit des variations au cours d'un cycle). On peut ainsi se demander si l'on a bien affaire à une croissance linéaire, ce qui semble être le consensus actuel pour les hyphes de *C. albicans* [221] [222], ou plutôt à une croissance de type exponentielle. Étant donné que l'on regarde seulement plusieurs articles successifs des hyphes en croissance dans les microcanaux, il est difficile de se prononcer précisément. De plus, il est difficile dans ces conditions de déterminer si cette augmentation de vitesse est une propriété intrinsèque des hyphes ou si elle est liée à des facteurs extérieurs. L'évolution du milieu de culture ou le confinement pourraient par exemple avoir un effet sur la morphologie ou la vitesse des hyphes. Il faudrait ainsi observer des hyphes sur de longues distances en milieu riche et non confiné pour vérifier si leur croissance est linéaire ou exponentielle.

5.5 Régulation du cycle cellulaire chez *C. albicans*

Les divers événements du cycle sont extrêmement bien régulés, puisqu'il permet aux articles d'avoir des tailles assez homogènes. De plus, la coordination de ces événements permet également à chacun des articles d'avoir un noyau et un seul, et au noyau-fille de traverser le préseptum alors que celui-ci n'est pas encore refermé.

5.5.1 Régulation pour les hyphes

Afin de déterminer si le cycle cellulaire des hyphes est régulé et de quelle façon, on peut à présent tracer pour chaque étape définie le volume final V_f en fonction du volume initial V_i. Pour rappel, les 3 comportements typiques décrits en introduction sont représentés en figure 5.19.

Afin de mieux visualiser ces 3 situations, nous pouvons aussi les représenter schématiquement sur la figure 5.20. Les volumes sont indiqués en ordonnées et le temps en abscisse. Pour chaque cas, la croissance de deux cellules, ayant des volumes initiaux ainsi que des vitesses de croissance différents, est illustrée. Nous avons vu que globalement une faible vitesse de croissance était associée à des faibles volumes d'où la représentation ici de la cellule de volume V_i' ayant une pente inférieure à celle de volume V_i.

Pour un *sizer* (figure 5.20a), le volume final est constant quelles que soient les valeurs initiales, ce qui donne donc une pente nulle sur le graphe de V_f en fonction de V_i (figure 5.19). Au contraire, cela entraîne une grande variabilité sur la durée de la phase : de petits volumes initiaux doivent croître beaucoup plus longtemps que les grands volumes, d'où la courbe indiquée sur la figure 5.19b.

Une pente égale à 1 pour V_f en fonction de V_i correspond à un comportement d'*adder* qui

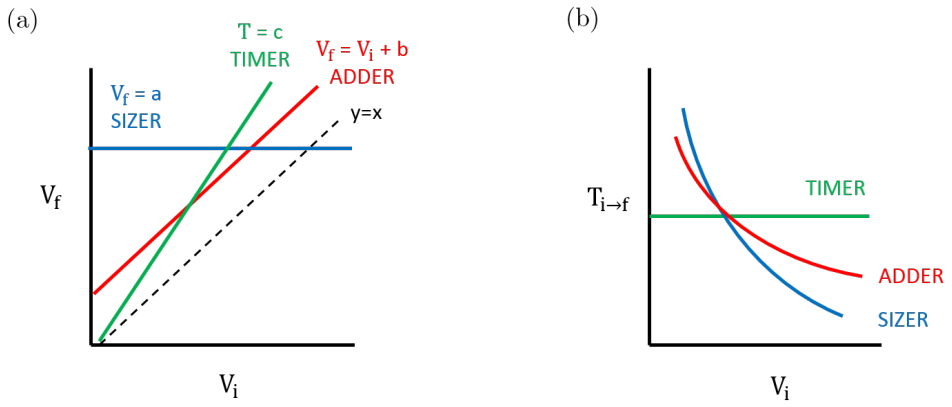


FIGURE 5.19 – Illustration des 3 trois comportements décrits en introduction, à savoir le *sizer*, l'*adder* et le *timer*. (a) Volume final V_f en fonction du volume initial V_i. (b) Durée de la phase ($T_{i\to f}$ entre initial et final) en fonction du volume initial V_i.

consiste à ajouter un volume fixe c quelle que soit la taille initiale (figure 5.20b). Cela implique tout de même des durées variables mais dans une moins grande mesure que pour le *sizer* (figure 5.19b).

Un *timer* quant à lui, fixe la durée de croissance, ce qui engendre de grandes disparités au niveau des volumes finaux. Sur la figure 5.20c, on voit bien que le volume ajouté est plus grand pour des volumes initiaux plus grands (car leur vitesse de croissance est plus grande). Cela mène donc à une pente supérieure à 1 sur la figure 5.19a.

Ce type de représentation pourra également être utilisé par la suite pour comprendre les graphes de V_f en fonction de V_i obtenus.

Étant donné que dans notre cas, les hyphes sont confinées dans des microcanaux de 2 µm de hauteur et largeur, on considérera de façon simplifié la longueur des articles.

Les données représentées ont été évaluées pour environ 150 cycles sur une quarantaine d'hyphes. Pour l'ensemble des figures de cette partie, les points noirs correspondent aux données brutes, et les données binnées, c'est-à-dire regroupées par classe, sont en rouge.

1ère étape : naissance à apparition du préseptum (L_0 à L_1)

Pour la première étape, il s'agit donc de tracer L_1 en fonction de L_0, ce qui est représenté sur la figure 5.21. Comme indiqué précédemment, cette étape est quasi-inexistante : on voit que $L_1 \simeq L_0$.

On peut remarquer que L_1 est souvent légèrement inférieure à L_0, ce qui signifierait que la naissance (c'est-à-dire la séparation des anneaux de septine en amont) se produirait après la formation du nouveau préseptum. En réalité, la naissance a à priori bien lieu avant ou au même moment que l'apparition du nouveau préseptum et le décalage observé provient des incertitudes de mesures. L_1 correspond à la taille de l'article, mesurée à partir de la position des septums. La longueur L_0 est quant à elle déterminée à partir de la position de l'apex de l'hyphe à l'instant de séparation complète des anneaux. Or l'intervalle de temps entre les images (généralement égal à 5 minutes) ne permet pas d'obtenir cette longueur avec précision.

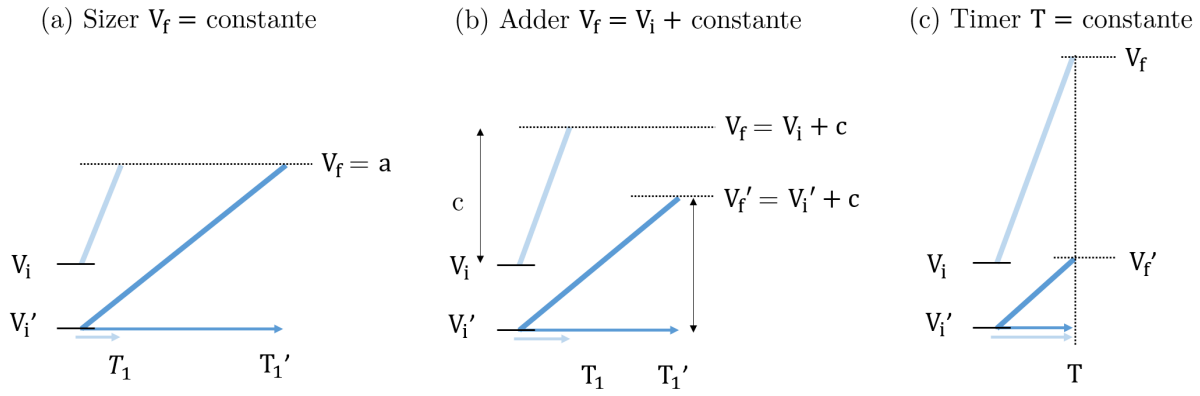


FIGURE 5.20 – Représentation schématique des comportements de *sizer*, *adder* et *timer*. Le volume est tracé en fonction du temps pour deux volumes initiaux différents $V_i > V_i$' associés à des vitesses de croissance différentes, le plus grand volume ayant une plus grande vitesse. En fixant un volume final, un volume ajouté ou une durée, ces schémas permettent d'expliquer les pentes obtenus sur la figure 5.19 et rendent compte de la variabilité finale en terme de tailles ou de durées.

Notons également que la séparation des deux anneaux de septine n'est pas instantanée, on peut en effet les voir s'écarter sur plusieurs images successives. Ici la séparation complète a été prise en compte, ce qui peut aussi surestimer L_0.

2ème étape : apparition du préseptum à division du noyau (L_1 à L_2)

La longueur à division du noyau L_2 en fonction de la longueur à formation du préseptum L_1 est représentée sur la figure 5.22a. Un ajustement des données binnées donne l'équation suivante : $L_2 = 1,1L_1 + 11$, c'est-à-dire une pente légèrement supérieure à celle d'un *adder*.

On peut également tracer la durée de cette phase en fonction de la longueur L_1, comme le montre la figure 5.22b.

Cette durée semble varier très peu avec la longueur initiale L_1, avec une moyenne égale à 40 minutes. On constate que les valeurs sont plus élevées pour les très faibles longueurs L_1, ce qui pourrait suggérer un faible mécanisme de compensation pour réguler la taille finale. Mais le faible nombre de points dans cette zone nous invite tout de même à la prudence sur ce phénomène.

Le fait d'avoir une durée relativement constante pour cette étape est cohérent avec d'autres observations effectuées sur d'autres organismes [212] [223]. En effet, pour *S. cerevisiae*, cette étape correspond à l'ensemble des phases S/G2/M, et a été caractérisée comme un *timer* [212].

Même si cette étape n'est pas un pur *timer*, on peut en définir une durée minimale T_{min}. Ce paramètre est important car il correspondrait donc à la durée minimale nécessaire pour effectuer le cycle de réplication et division du noyau. Ainsi, même si la longueur initiale est très grande, la durée de cette étape ne peut pas être drastiquement réduite.

On peut alors reprendre la représentation schématique d'un *adder* avec deux volumes initiaux différents auquel on ajoute une durée minimale de croissance. Comme on le voit sur la figure 5.23, cela a pour conséquence de fixer la durée de la phase pour les grands volumes initiaux/grandes

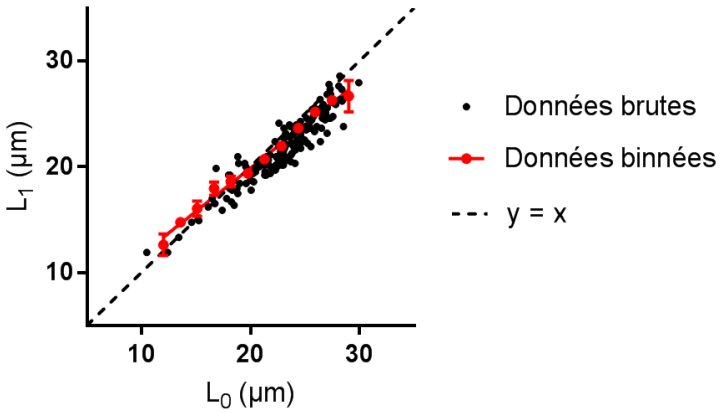


FIGURE 5.21 – L_1, la longueur de l'article, c'est-à-dire au moment de la formation du préseptum en fonction de L_0, la longueur à la naissance de l'article, qui correspond au moment de séparation avec l'article précédent (n=153).

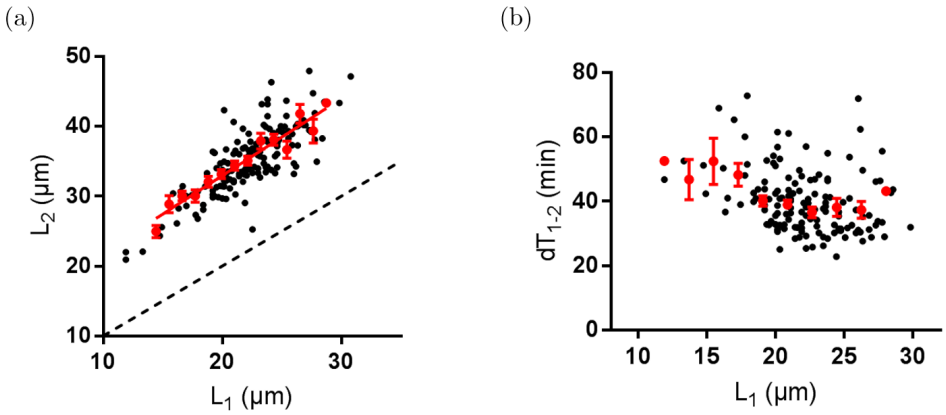


FIGURE 5.22 – Détermination du mode de régulation de l'étape 2 chez les hyphes. (a) L_2, la longueur de l'article au moment de la division du noyau en fonction de L_1, la longueur de l'article, c'est-à-dire au moment de la formation du préseptum (n=153). (b) Durée de cette phase (entre L_1 et L_2) en fonction de la longueur initiale L_1.

vitesses de croissance, tandis que les faibles volumes/faibles vitesses peuvent dépasser cette durée minimale pour des critères de taille.

Cela est cohérent avec le résultat de la figure 5.22b, ainsi que celui de la figure 5.22a puisque l'ajout de cette durée minimale entraîne de plus grandes variations en taille donc une pente supérieure à 1. On a donc ici une étape ayant un comportement intermédiaire entre un *adder* et un *timer*, qui pourrait s'expliquer avec une durée de phase minimale fixée. Toutefois, des faibles modulations de cette durée permettent de réduire les fluctuations en taille résultant en une pente seulement légèrement supérieure à 1. On notera également que ce modèle (en figure 5.23b) semble en accord avec celui de *sizer* dépendant de la vitesse de croissance mentionné dans la partie précédente : la taille finale dépend de la vitesse de croissance, par l'intermédiaire d'une durée minimale.

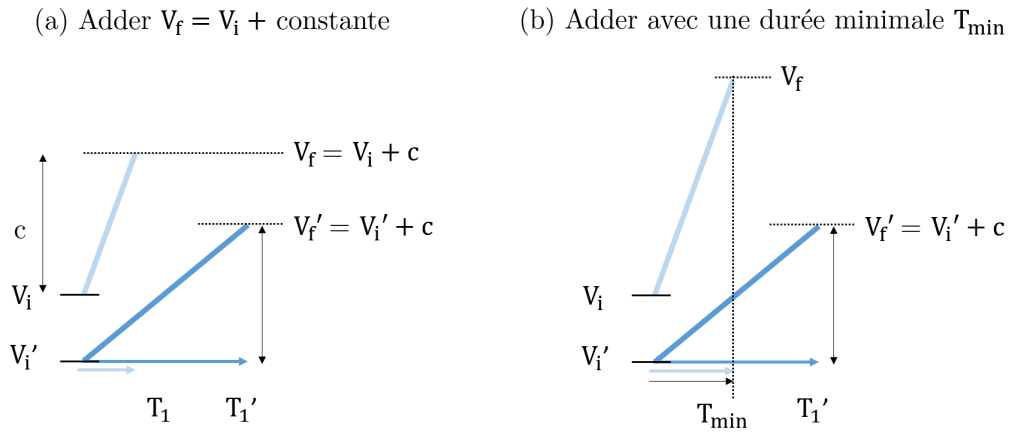


FIGURE 5.23 – Représentation schématique permettant d'expliquer le type de régulation de la phase 2 avec l'ajout d'une durée minimale du cycle.

3ème étape : division du noyau à division cellulaire (L_2 à L_3)

Enfin on cherche à déterminer le type de régulation de la dernière étape. Pour cela, on trace la longueur à séparation des articles L_3 en fonction de la longueur à division du noyau L_2, sur la figure 5.24a. L'ajustement des données donne ici une pente égale à 1, ce qui suggère un mécanisme d'*adder*.

En traçant la durée de cette phase en fonction de la longueur initiale L_2, on s'aperçoit qu'il y a cette fois une plus nette variation de cette durée. De faibles volumes initiaux, qui ont une plus faible vitesse, vont croître plus longtemps avant d'effectuer la division cellulaire, et donc d'entamer un nouveau cycle. Cela peut effectivement correspondre à un modèle de régulation en taille comme le *adder* car cette modulation de la durée de la phase a pour effet de réduire les fluctuations de taille finale, comme indiqué sur la figure 5.19.

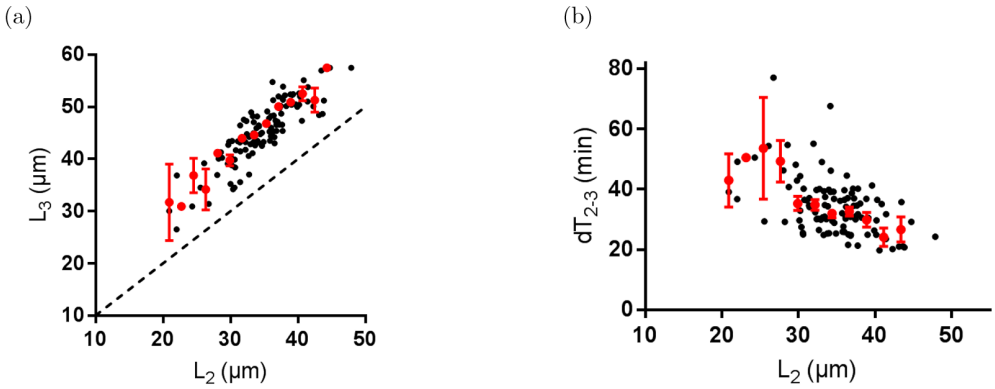


FIGURE 5.24 – Détermination du mode de régulation de l'étape 3 chez les hyphes. L_3, la longueur de l'article à division cellulaire, c'est-à-dire au moment de la séparation des anneaux de septine en fonction de L_2, la longueur de l'article au moment de la division du noyau (n=111). (b) Durée de cette phase (entre L_2 et L_3) en fonction de la longueur initiale L_2.

Notons que cette étape est généralement inexistante pour les cellules animales car la division

du noyau est immédiatement suivie de la cytokinèse, donc la division cellulaire. Au contraire, ici cette phase est assez longue et d'autant plus importante qu'elle contient une forme de régulation de la taille des cellules.

Régulation globale : naissance à division cellulaire

Enfin, on peut également tracer L_3 en fonction de L_0 sur la figure 5.25 afin d'avoir une idée globale du type de régulation sur l'ensemble du cycle. Le faible nombre de valeurs pour les petites longueurs L_0 permet difficilement de se fier aux points les plus extrêmes. Cependant, le reste de ce graphe semble indiquer une plus grande pente pour les grands L_0 que pour les petits, ce qui suggère une meilleure régulation en taille pour les faibles volumes initiaux.

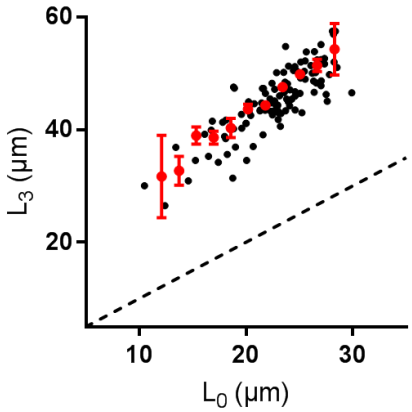


FIGURE 5.25 – Détermination du mode de régulation global du cycle cellulaire chez les hyphes. L_3, la longueur de l'article à division cellulaire, c'est-à-dire au moment de la séparation des anneaux de septine en fonction de la longueur L_0 à la naissance (n=112).

5.5.2 Comparaison avec les levures

Maintenant que nous avons analysé la régulation des différentes étapes du cycle pour les hyphes, nous souhaitons la comparer à celle des levures de *C. albicans*. Le but est ici de déterminer si les différents morphotypes ont des progressions du cycle cellulaire différentes ou si quelque soit le mode de croissance, la régulation se fait de la même façon.

Contrairement aux hyphes, l'analyse du cycle des levures n'a pas encore été automatisée. Le contour des levures a été tracé manuellement pour chaque étape et assimilé à une ellipse afin d'obtenir leur grand axe a et petit axe b. En supposant que les levures sont des ellipsoïdes de révolution, leur volume est alors égal à $V_{levures} = \frac{4}{3}\pi ab^2$.

À nouveau, des mesures avec exclusion de fluorescence devraient être réalisées afin de vérifier cette hypothèse, qui a toutefois déjà été utilisée dans d'autres travaux pour la levure *S. cerevisiae* par exemple [220]. Rendre cette analyse automatique nécessiterait dans un premier temps la fabrication d'une nouvelle puce ayant des microcanaux de dimensions adaptées aux levures. L'idéal serait d'avoir, de la même façon que pour les hyphes, un canal de largeur et hauteur égal au diamètre des levures, évitant ainsi de les écraser ou d'avoir des problèmes de focalisation. Cela

permettrait aussi une identification plus facile des cellules mères et filles puisqu'elles seraient forcées de s'orienter dans le sens du canal.

Pour rappel, les étapes clés pour les levures sont illustrées sur la figure 5.11.

Par souci de comparaison, nous avons ici converti les longueurs des hyphes en volumes en utilisant un diamètre de 2 µm. Les graphes suivants comparent les résultats obtenus pour les hyphes (points noirs) et pour les levures (carrés bleus).

Concernant la première étape, de la séparation des cellules à l'apparition du préseptum, on voit sur la figure 5.26 que V_1 est également très proche de V_0 pour les levures. Autrement dit, cette phase qui est quasi-inexistante chez les hyphes est très courte aussi chez les levures. La figure 5.26b montre la durée de cette étape en fonction du volume initial V_0 pour les levures avec une meilleure résolution temporelle que pour les hyphes (pour lesquelles cette durée est inférieure à 5 minutes).

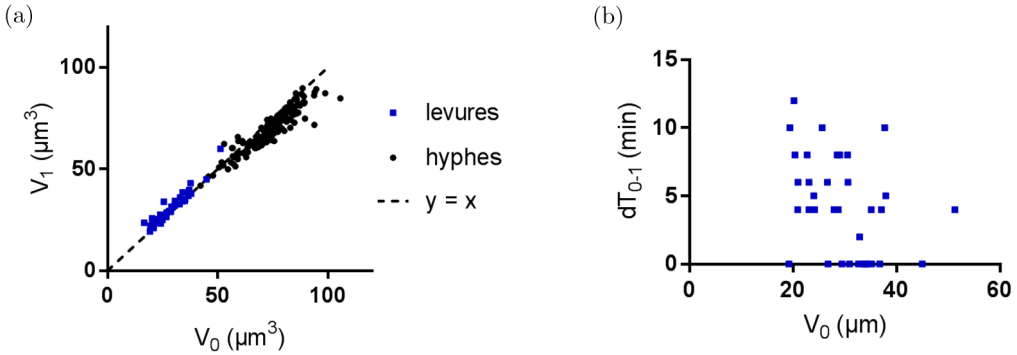


FIGURE 5.26 – Comparaison de la régulation des hyphes et levures pour l'étape 1 du cycle. (a) V_1, le volume de l'article ou de la levure à apparition du préseptum en fonction de V_0, son volume à la naissance (n=153 pour les hyphes et n=63 pour les levures). (b) Durée de cette phase (entre V_0 et V_1) en fonction du volume initial V_0.

Entre la formation du nouveau préseptum et la division du noyau, nous avons vu pour les hyphes qu'une durée minimale était nécessaire pour la réplication et division du noyau. On voit sur la figure 5.27 que la pente pour les levures est supérieure à celle pour les hyphes. Cela indique un contrôle en temps de cette phase encore plus prononcé pour les levures. Cependant, il semble que la durée de cette étape soit plus grande pour les levures, avec une moyenne de 48 minutes.

La dernière phase entre la division du noyau et la séparation des cellules est représentée sur la figure 5.28. Sa durée est nettement plus petite pour les levures, mais on observe tout de même une diminution de cette durée avec le volume initial V_2. Les comportements pour les hyphes et les levures semblent donc être similaires avec une modulation de la durée de croissance dans le but de compenser les variations de taille. Cependant, les points sont décalés indiquant des volumes minimaux et durées minimales différents selon le mode de croissance, levures ou hyphes.

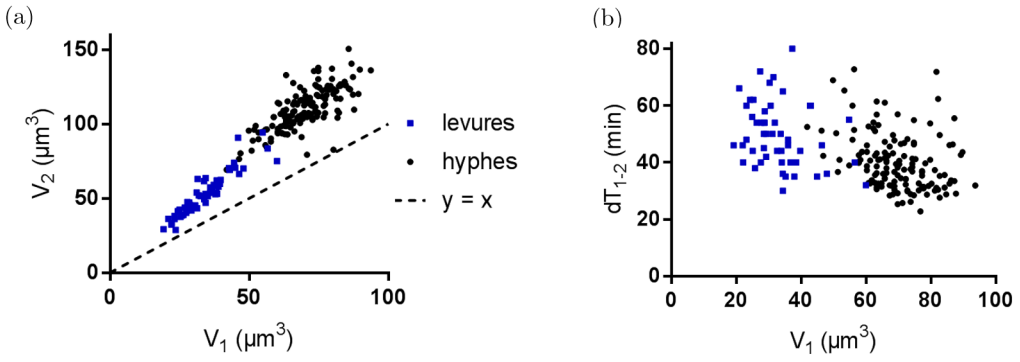


FIGURE 5.27 – Comparaison de la régulation des hyphes et levures pour l'étape 2 du cycle. (a) V_2, le volume de l'article ou de la levure à division du noyau en fonction de V_1, son volume à apparition du préseptum (n=153 pour les hyphes et n=61 pour les levures). (b) Durée de cette phase (entre V_1 et V_2) en fonction du volume initial V_1.

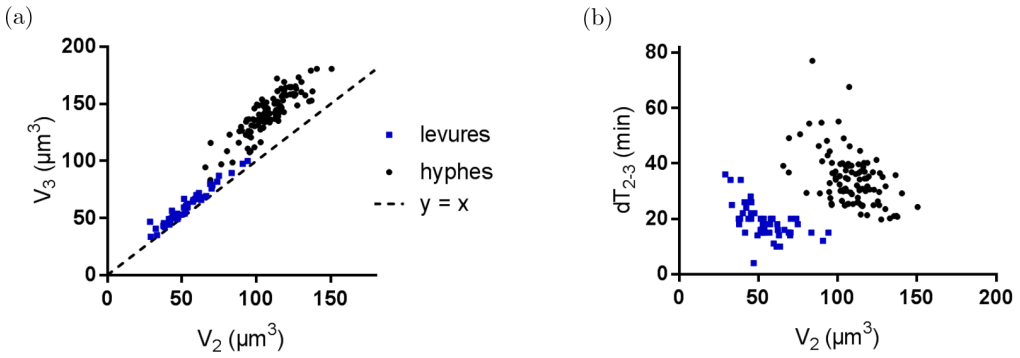


FIGURE 5.28 – Comparaison de la régulation des hyphes et levures pour l'étape 3 du cycle. (a) V_3, le volume de l'article ou de la levure à division cellulaire en fonction de V_2, son volume à division du noyau (n=111 pour les hyphes et n=57 pour les levures). (b) Durée de cette phase (entre V_2 et V_3) en fonction du volume initial V_2.

5.6 Discussion et perspectives

Pour commencer notre étude du cycle cellulaire chez les hyphes de *C. albicans*, nous avons du en définir les étapes caractéristiques identifiables à partir des moyens dont nous disposons, c'est-à-dire ici avec un marquage des noyaux et des septums.

5.6.1 Dynamique du cycle cellulaire

Dans un premier temps, nous avons pu remarquer la dynamique du noyau particulièrement intéressante puisqu'elle est parfaitement coordonnée de façon à avoir un noyau dans chaque article avant qu'ils ne se séparent. Nous avons pu noter d'importantes variations de vitesse de déplacement selon les phases du cycle. Cela est probablement lié au cytosquelette et un marquage combiné des microtubules, du noyau et des septums pourrait sans doute apporter des réponses quant au mécanisme impliqué.

De même, on observe également des variations de vitesse de croissance de l'hyphe au cours

d'un cycle avec une vitesse plus faible au moment de l'apparition d'un nouveau préseptum (correspondant aussi à la séparation de deux articles). Cela semble cohérent avec d'autres études montrant une réduction de la vitesse au moment de la formation du bourgeon pour les levures [220] [224]. Des variations sont également présentes au cours de la croissance d'une hyphe, mais il reste encore à déterminer si cela est lié à des facteurs environnementaux ou à une véritable caractéristique des hyphes.

5.6.2 Des cycles nucléaires et cellulaires décorrélés ?

On note ici une différence importante avec les cycles cellulaires généralement étudiés, notamment ceux des cellules animales pour lesquelles la séparation des noyaux est directement suivie de la séparation des cellules. Les différentes étapes du cycle sont représentées sur la figure 5.29 en différenciant cette fois celles associées au noyau et celles associées à la cellule, distinguant ainsi ces deux séparations. En règle générale (a), la phase G1 commence à la naissance de la cellule, c'est-à-dire lorsqu'elle s'est séparée de la cellule-mère. La réplication de l'ADN démarre au début de la phase S et correspond pour les levures à l'apparition des anneaux de septine. Enfin, la fin de la mitose sépare les deux noyaux, immédiatement suivie de la cytokinèse. Autrement dit, la 3ème phase représentée sur cette figure n'existe pas dans le cas des cellules animales.

Mais la désynchronisation de la division du noyau et de la cytokinèse est en fait une particularité de la levure à fission *S. pombe* [225]. En effet, son cycle cellulaire est organisé de façon différente, comme le montre la figure 5.29b. Après sa division nucléaire, la cellule passe très rapidement en phase S, avec une phase G1 très courte. La réplication d'ADN (phase S) commence avant même la séparation des cellules, ce qui donne donc lieu à une étape 3, telle qu'on l'a identifiée dans cette étude (entre séparation des noyaux et séparation des cellules), non négligeable.

Cette désynchronisation semble être présente également chez *C. albicans*, non seulement pour les hyphes, mais également pour les levures. La durée moyenne de cette étape est de l'ordre de 20 minutes pour les levures et de 32 minutes pour les hyphes.

Ces résultats sont assez surprenants en ce qui concerne les levures de *C. albicans*. En effet, on pourrait s'attendre à avoir un comportement plutôt similaire entre les levures bourgeonnantes que sont *S. cerevisiae* et *C. albicans*.

On peut donc se demander si, à l'exemple des levures à fission, la réplication d'ADN commence avant la véritable séparation des cellules pour *C. albicans*. Or pour les levures bourgeonnantes, le début de la réplication (début de la phase S) est à priori associé à l'apparition des anneaux de septine et donc du bourgeon [218]. Pour conclure plus précisément sur le fonctionnement du cycle des hyphes, il faudrait déterminer si c'est aussi le cas pour les hyphes. Pour cela, nous avons envisagé de suivre l'évolution de la taille des noyaux grâce au marquage fluorescent de Nop1, afin de déterminer le début de la réplication. De premiers essais semblent indiquer qu'il est effectivement possible de visualiser l'augmentation de la taille du noyau mais ne nous permettent pas de conclure pour le moment car cela nécessite une meilleure résolution spatiale que celle de la plupart de nos expériences.

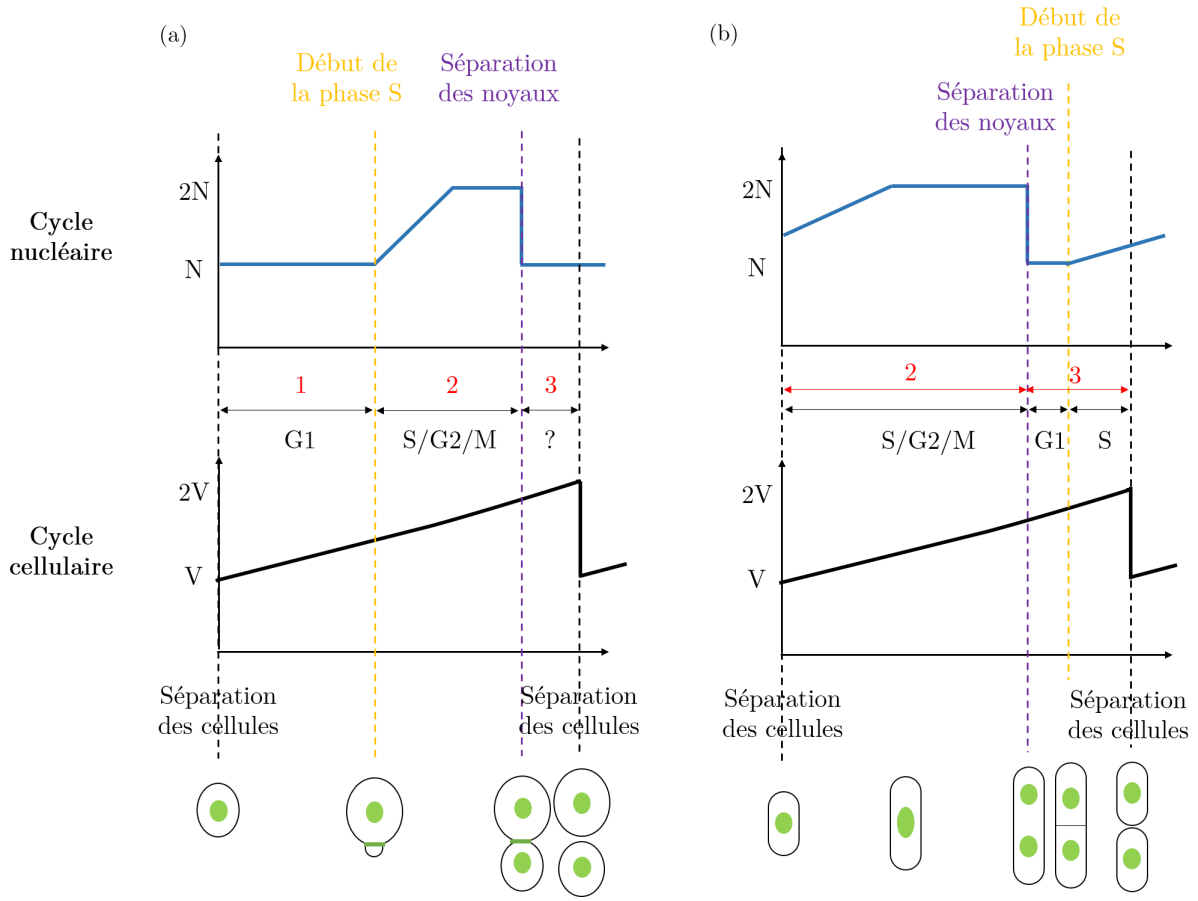


FIGURE 5.29 – Illustration de la progression du cycle cellulaire, avec d'une part les événements associés au noyau et d'autre part à la cellule. (a) Dans le cas classique de cellules animales où la naissance correspond au début de la phase G1, et où la phase 3 est à priori quasi-inexistante. (b) Dans le cas de la levure à fission *S. pombe* où la séparation des noyaux et des cellules est décorrélée, cette dernière se déroulant en fait pendant la phase S.

5.6.3 Régulation du cycle cellulaire de *C. albicans*

Nous avons vu en introduction que le cycle cellulaire de *S. cerevisae* est principalement contrôlé en phase G1, qui est aussi la phase principale. Il y a ainsi un point de décision en fin de phase G1, appelé START qui détermine si la levure s'engage ou non dans le suite du cycle.

Pour *C. albicans*, l'étape 1 entre la naissance et l'apparition du préseptum, qui pourrait correspondre à la phase G1 de *S. cerevisiae*, est très courte. Sa durée est inférieure à 5 minutes pour les hyphes, et elle est relativement faible aussi pour les levures (inférieure à 10 minutes). À nouveau, nous avons ici une différence importante entre les levures de *C. albicans* et celles de *S. cerevisiae*.

L'étape 2 entre l'apparition du préseptum et la division du noyau semble être plutôt contrôlée en temps qu'en taille, ce qui donne lieu à une augmentation des fluctuations en taille des cellules (levures ou hyphes). On peut alors supposer que la durée de cette phase est principalement déterminée par le temps nécessaire à la réplication d'ADN et à la mitose [212]. Notons cependant que les durées moyennes de cette phase sont légèrement différentes entre les levures (50 min) et

les hyphes (40 min).

Enfin, nous avons déjà discuté précédemment de la 3ème étape entre la séparation des noyaux et celle des cellules qui est ici assez importante. Elle l'est d'autant plus que c'est essentiellement lors de cette étape que la modulation en temps permet de réduire les fluctuations en taille des articles ou levures : les petites cellules passent plus de temps dans cette phase. Mais cette compensation n'est pas parfaite et les petites cellules initiales produisent tout de même des plus petites cellules finales.

Globalement, la taille finale des articles en fonction de leur taille à la naissance semble adopter une pente proche de 1, avec de légères variations entre les différentes phases. Cela correspondrait à un mécanisme global de type *adder*, qui revient à ajouter un volume constant. Ce modèle semble être assez universel car présent chez différents types cellulaires : levures [211], bactéries [208] ou cellules animales [223]. Des mécanismes d'activateur et d'inhibiteur, comme celui évoqué en introduction, pourraient effectivement expliquer ce type de régulation [215] [208].

Notons cependant que pour l'ensemble des résultats exposés ici, il serait nécessaire de vérifier leur validité avec la souche de référence SC5314 afin de confirmer que la mutation réalisée pour obtenir un marquage fluorescent n'affecte pas le cycle cellulaire, comme cela semble être le cas pour la souche marquée pour les microtubules. Pour cela, un marquage Hoechst peut être utilisé pour distinguer les noyaux. Cependant, ce marquage n'est pas idéal pour un suivi prolongé de la croissance des hyphes. Nous avons réalisé plusieurs expériences dans ce sens, mais l'ajustement de la concentration de Hoechst ainsi que de la durée et puissance d'exposition est assez difficile. Ainsi dans la plupart des cas, la croissance des hyphes s'arrête rapidement ou le marquage est trop faible pour pouvoir extraire les données nécessaires. Les septums étant visibles sans marquage, nous avons tout de même confirmé avec cette souche de référence que la durée de la première phase (entre séparation des articles et apparition du préseptum) est très faible chez les hyphes (de l'ordre de quelques minutes).

L'étude des volumes à chaque événement important du cycle nous donne une première idée de la façon dont procèdent les hyphes pour réguler leur taille. Cependant, notre analyse est limitée car assez peu de points se trouvent dans les cas extrêmes, c'est-à-dire pour des très petits ou très grands volumes initiaux. Ces points seraient particulièrement pertinents pour déterminer s'il existe des volumes ou durées minimales notamment. Pour aller plus loin, il serait donc intéressant de chercher à perturber le cycle cellulaire à une étape spécifique afin d'obtenir des volumes de taille non standard et ainsi élargir la gamme de volumes analysés. Cela a par exemple été réalisé pour étudier le cycle de cellules animales [223]. Un traitement inhibant une kinase ayant un rôle majeur dans le cycle cellulaire a été utilisé afin de produire des cellules de volumes initiales plus élevés. Plusieurs études chez les levures montrent qu'il est également possible d'arrêter la progression du cycle cellulaire [226].

CONCLUSION

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons exploré plusieurs aspects de la croissance des hyphes de *Candida albicans* à l'aide d'un contrôle de leur micro-environnement, grâce aux outils de la microfluidique.

Dans un premier temps, nous avons cherché à développer des systèmes microfluidiques spécifiques pour la mesure des propriétés mécaniques des hyphes de *C. albicans*. Une meilleure caractérisation de ces organismes présente un grand intérêt. En effet, dans l'objectif de trouver des antifongiques efficaces, il est important d'identifier au mieux les facteurs de virulence, c'est-à-dire les éléments qui peuvent rendre une souche plus virulente qu'une autre. Pour cela, effectuer des criblages de souches modifiées peut être intéressant puisque cela permet d'identifier les gènes responsables de certaines caractéristiques. D'un point de vue du phénotype mécanique, on peut par ailleurs supposer qu'une hyphe ayant une rigidité plus faible parviendra plus difficilement à pénétrer les barrières épithéliales, ce qui en fait un enjeu majeur pour réduire la capacité d'invasion de *C. albicans*. Le système développé ici a permis d'accéder au module de flexion des hyphes, montrant que celui-ci est modifié par l'action d'une drogue, la caspofungine. Bien que ce système ne puisse cependant pas être utilisé pour cribler un grand nombre de souches du fait de ses aspects trop "bas-débit", il peut toutefois être utile lorsque des gènes ont déjà été ciblés, pour tester l'effet d'une drogue ou pour étudier d'autres phénomènes comme l'effet d'une contrainte de cisaillement sur les hyphes.

Grâce à des dispositifs microfluidiques, nous avons donc pu soumettre les hyphes à diverses contraintes telles qu'un flux transverse ou encore différents niveaux de confinement, et ainsi étudier leurs réponses.

Ce micro-environnement confiné nous a permis de découvrir un comportement bien particulier qu'est la croissance sinusoïdale ou hélicoïdale des hyphes. Cette étude s'inscrit en fait plus largement dans la compréhension de la croissance hyphale, et de la façon dont les hyphes orientent leur croissance. Des pistes peuvent ainsi être envisagées concernant les mécanismes contrôlant la direction de croissance, ici en réponse à des stimuli physiques et mécaniques de confinement, d'adhésion ou de rigidité. Ce comportement pourrait présenter un intérêt en terme d'efficacité d'exploration et de pénétration qui est une des caractéristiques importantes de ces

cellules invasives à croissance apicale, de la même façon que les racines de plantes ou les tubes de pollen par exemple. Cette stratégie d'exploration se manifeste également par la tendance des hyphes à chercher les interstices, c'est-à-dire à se glisser dans de petits espaces, ou aux interfaces.

Mais nous pouvons également nous interroger sur leur réponse à d'autres types de stimuli, par exemple chimiques. La question du chimiotropisme s'est notamment posée, et à nouveau l'utilisation de puces microfluidiques pourrait permettre de répondre à cette question non élucidée en ce qui concerne les champignons filamenteux comme *C. albicans*.

Dans le cadre d'une meilleure compréhension de la croissance hyphale, nous avons également effleuré le sujet extrêmement vaste qu'est le cycle cellulaire, très peu étudié pour *C. albicans*. En effet, la question fondamentale de la façon dont les cellules parviennent à coordonner leur croissance et leur cycle cellulaire se pose également dans le cas particulier des articles composant les hyphes. Tandis que *S. cerevisae* et *S. pombe* constituent les levures modèles pour ce type d'étude, *C. albicans* et en particulier sa forme hyphale semblent présenter également certaines spécificités qui valent la peine d'être étudiées pour une meilleure compréhension de cet organisme. La comparaison entre les cycles cellulaires des levures et des hyphes est aussi intéressante puisqu'elle devrait permettre de déterminer, à notre connaissance pour la première fois, si le type de régulation du cycle cellulaire est associé à un organisme ou si elle dépend de sa morphologie (hyphe ou levure). L'utilisation de microcanaux et d'une souche fluorescente permet une analyse en grande partie automatisée pour les hyphes, et de nouvelles expériences pourraient compléter ces données et confirmer les tendances obtenues ici.

De nombreuses questions se posent encore, mais nous avons montré que l'utilisation d'un micro-environnement contrôlé offrait de multiples possibilités. Nous pouvons enfin envisager dans une prochaine étape de nous rapprocher d'un modèle *in vivo* de type "organes sur puces" de façon à placer *C. albicans* dans un environnement encore plus proche de la situation *in vivo*. Des modèles d'intestin sur puces notamment pourraient être utilisés pour étudier l'interaction de *C. albicans* avec son environnement dans un cadre plus complexe, en combinant différentes contraintes et différents types cellulaires. Dans ce cas, le confinement serait non pas exercé entre deux parois de PDMS, mais entre des cellules épithéliales ou dans la matrice extracellulaire, et un flux pourrait être appliqué de façon à simuler la circulation sanguine.

En conclusion, ce travail a exploré un ensemble de comportements de la forme hyphale de *C. albicans* en réponse à son environnement physique. Les technologies issues de la microfluidique se sont révélées un outil puissant pour l'observation et la mesure quantitative de ces comportements. De nombreuses questions relatives à cet organisme fascinant restent néanmoins non résolues, comme celle du mécanisme lié aux mouvements sinusoïdaux ou hélicoïdaux des hyphes, ou encore celle des modalités de transition morphologique (levure/pseudo-hyphe/hyphe) qui n'a été que peu évoquée dans ce travail mais qui est un aspect clé de la virulence de *C. albicans*. Ce travail biophysique ouvre ainsi un certain nombre de piste de recherches pour le futur.

ANNEXE A

DESIGN DES PUCES

Les dessins réalisés sur le logiciel Clewin pour la fabrication des puces sont présentés sur la figure A.1. D'abord, le design complet (figure a) contient 5 fois la même puce, de façon à rentabiliser la production de puces. Comme cela a été expliqué dans le chapitre 2, les puces contiennent des canaux de différentes hauteurs, ce qui requiert une étape d'alignement. Pour cela, des croix d'alignement sont également ajoutées sur ce design. Celle qui est encadrée en rouge est utilisée pour l'alignement manuel avec la MJB4 (pour aligner la dernière couche de 30 µm). La croix encadrée en vert a été ajoutée spécifiquement pour l'alignement des microcanaux à la µPG, car cette croix est adaptée à cet alignement en partie automatisé. Ces croix sont donc placées sur chacune des couches qui doivent être alignées.

La puce complète à 3 hauteurs (1,5, 6,5 et 30 µm) est représentée sur la figure A.1c. Un zoom sur les microcanaux permet de distinguer les designs correspondant à chacune des couches (figure d). On construit d'abord des microcanaux complets d'épaisseur 1,5 µm, puis pour les besoins de nos expériences, seules certaines parties de ces microcanaux sont recouverts de la deuxième couche. Enfin la dernière correspond aux grandes chambres de part et d'autre des microcanaux ainsi qu'aux entrées et sorties.

On voit aussi sur la figure A.1d que les entrées des microcanaux sont dessinées sous forme de poches adaptés aux levures. Une portion de canal de 2,5 µm est placée avant de l'élargir à 10 µm, de façon à bloquer les levures à l'entrée.

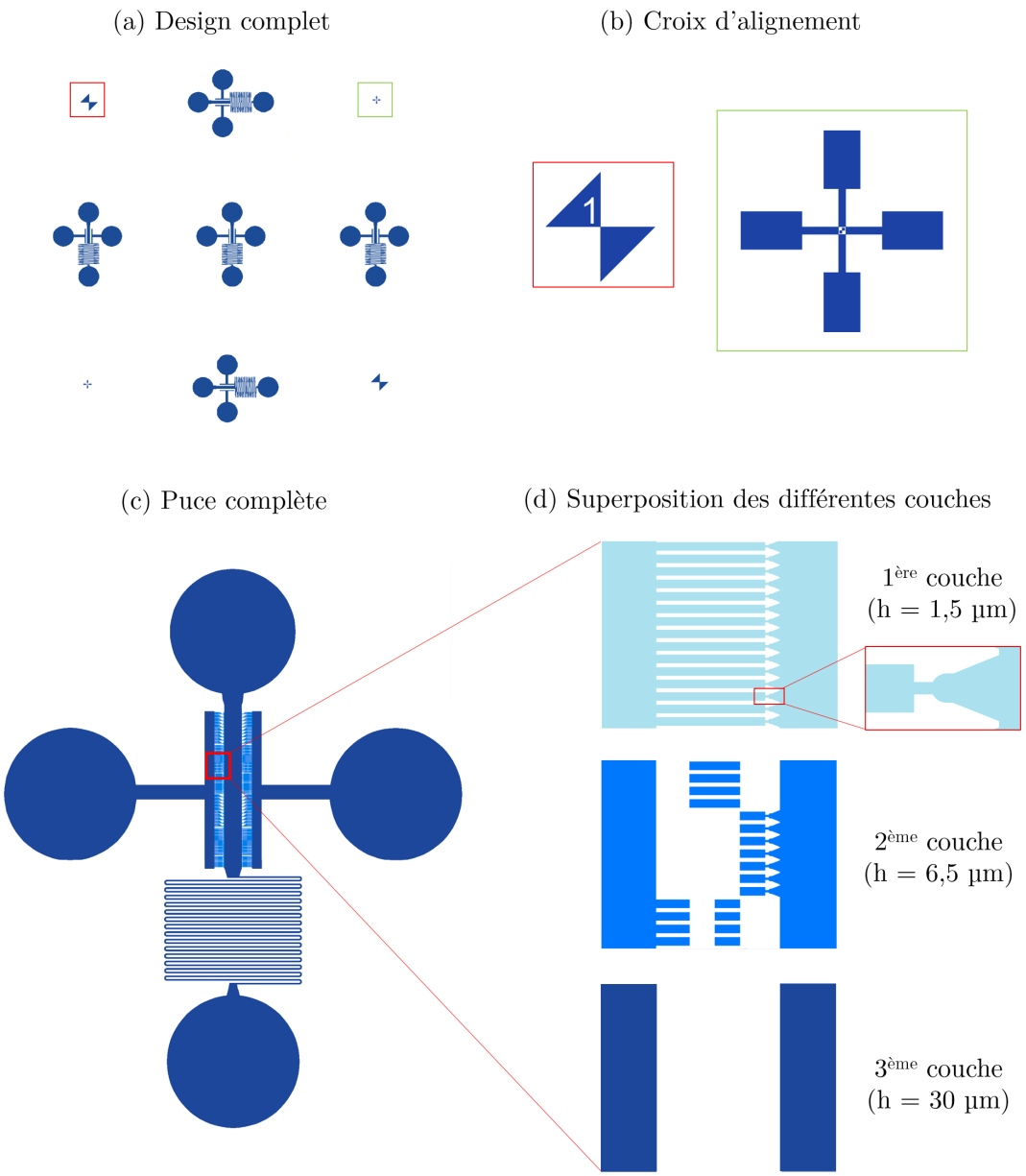


FIGURE A.1 – Design des puces à 3 hauteurs différentes réalisé sur le logiciel Clewin. (a) Design complet du wafer contenant 5 puces identiques ainsi que les croix d'alignement. (b) Croix d'alignement utilisées d'une part pour aligner la dernière couche avec la MJB4 (en rouge), et d'autre part pour aligner la seconde couche de 6.5 µm sur les microcanaux avec la µPG (en vert). (c) Représentation globale de la puce avec les entrées, sorties et grandes chambres de 30 µm. (d) Un zoom (encadré rouge) sur les microcanaux montre la décomposition des différentes couches réalisées.

ANNEXE B

GÉNOTYPE DES SOUCHES

Nop1-YPF/Cdc3-GFP - Souche YJB8860 [113]
BWP17 *NOP1/NOP1-YFP::URA3 CDC3/CDC3-GFP::HIS1*

Tub2-GFP - Institut Pasteur (Sophie Bachellier-Bassi)
SC5314 *TUB2/TUB2::GFP-NAT*

Nop1-CFP /Mlc1-YFP - Souche YMG8255 [42]
BWP17 *MLC1/MLC1-YFP::URA3 NOP1/NOP1-CFP::HIS1*

$\Delta\Delta$*pga*59$\Delta\Delta$*pga*62 - Souche CEC377 [114]
BWP17 *pga59-pga62*Δ*::HIS1/pga59-pga62*Δ*::ARG4 RPS1/RPS1::CIp10*

$\Delta\Delta$*msb*2 - Souche FCCa30 [115]
CAI4 *msb2*Δ*::hisG/msb2*Δ*::hisG ura3*Δ*::*λ*imm434/URA3*

$\Delta\Delta$*als*3 - Souche CAYF178U [116]
ura3Δ*::*λ*imm434::URA3-IRO1/ura3*Δ*::*λ*imm434 als3::ARG4/als3::HIS1*
arg4Δ*::hisG/arg4*Δ*::hisG his1*Δ*::hisG/his1*Δ*::hisG*

ANNEXE C

FLEXION D'UN CYLINDRE

L'objectif de cette annexe est de redémontrer les équations utilisées dans le cadre de la théorie élastique des poutres, et plus précisément de montrer celles nécessaires à la mesure du module de flexion et module de Young des hyphes. On s'intéresse donc à la déformation en flexion d'un cylindre, assimilable à une poutre. La figure C.1 montre les paramètres permettant de décrire cette poutre en flexion.

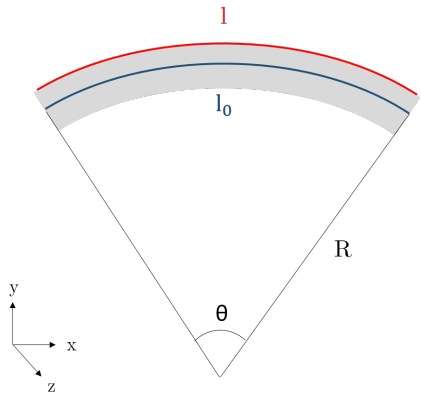


FIGURE C.1 – Représentation schématique d'une poutre en flexion, ayant un rayon de courbure R.

On peut commencer par écrire simplement la loi de Hooke reliant la contrainte σ (en Pa) à l'allongement relatif ϵ (sans dimension) par l'intermédiaire du module élastique E (en Pa).

$$\sigma(z) = E\epsilon \tag{C.1}$$

ϵ correspond donc au rapport entre l'allongement $l - l_0$ et la longueur initiale l_0, longueurs que l'on peut exprimer en fonction du rayon de courbure de la poutre R et de l'angle θ.

$$\epsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{(R + y)\theta - R\theta}{R\theta} = \frac{y}{R} \tag{C.2}$$

Le moment est donné par l'équation suivante :

$$M = \int\int \sigma z dydz = \frac{E}{R}\int\int y^2 dydz = \frac{EI}{R} \tag{C.3}$$

avec I le moment quadratique en flexion de la poutre et EI le module de flexion.

Dans le cas d'une poutre de section circulaire, on a

$$I = \int\int z^2 dydz = \frac{\pi r^4}{4} \tag{C.4}$$

En utilisant l'équation C.3 et l'expression suivante pour la courbure dans le cas de faibles déformations, c'est-à-dire pour $y' = \frac{dy}{ds} << 1$ avec s la position curviligne

$$C = \frac{1}{R} = \frac{d^2y}{ds^2} \tag{C.5}$$

On peut écrire

$$M(s) = EI\frac{d^2y}{ds^2} \tag{C.6}$$

On peut ensuite écrire l'équilibre des moments pour l'ensemble de cette poutre :

$$\frac{dM}{ds} + \vec{t} \otimes \vec{F} = 0 \tag{C.7}$$

$$EI\frac{d^3y}{ds^3} + \vec{t} \otimes \vec{F} = 0 \tag{C.8}$$

avec $\vec{t}$ le vecteur tangent.

Cette équation peut alors être utilisée pour obtenir l'expression de la déflexion δ de la poutre soumise à différents profils de force.

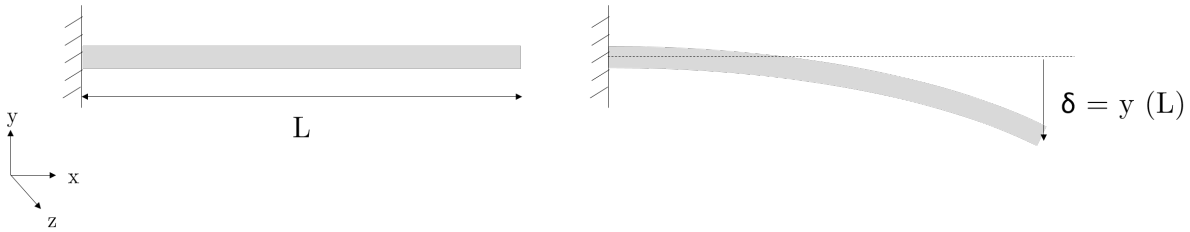


FIGURE C.2 – Représentation schématique d'une poutre en flexion, de longueur L, encastrée d'un côté et libre de l'autre.

Dans le cas simple d'une poutre encastrée, comme représentée sur la figure C.2, les conditions aux limites pour y sont les suivantes :

$$y(0) = 0 \tag{C.9}$$

$$y'(0) = 0 \tag{C.10}$$

$$y''(L) = 0 \tag{C.11}$$

On peut ensuite déduire le profil $y(s)$ le long de la poutre et puis particulièrement la déflexion maximale δ en $s = L$. Cela dépend alors du profil de force appliqué sur la poutre. Le cas le plus simple est celui d'une force F appliquée uniquement à l'extrémité en L, on a alors à partir de l'équation C.8 :

$$EI\frac{d^3y}{ds^3} - F = 0 \tag{C.12}$$

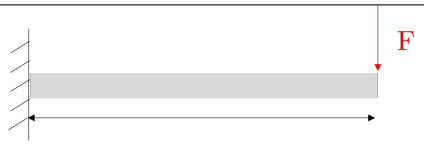
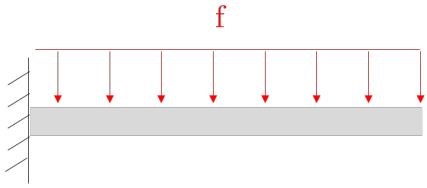
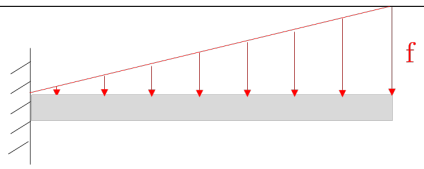
En intégrant cette équation à l'aide des conditions aux limites, on trouve finalement :

$$y(s) = \frac{F}{EI}(\frac{s^3}{6} - \frac{Ls^2}{2}) \tag{C.13}$$

Cela donne une déflexion maximale δ, à l'extrémité de la poutre :

$$\delta = y(L) = -\frac{FL^3}{3EI} \tag{C.14}$$

Cette déflexion peut ainsi être calculée pour différents profils de force, plusieurs situations sont illustrées dans le tableau ci-dessous, les expressions obtenues pour la déflexion δ y sont également reportées.

Profil de force	Représentation schématique	Déflexion maximale δ
Force F à l'extrémité		$\delta = \frac{FL^3}{3EI}$
Force uniforme f		$\delta = \frac{fL^4}{8EI}$
Force croissante linéaire		$\delta = \frac{11fL^4}{120EI}$

Comme décrit dans le chapitre 3, pour nos calculs, nous avons considéré un profil de force légèrement différent avec une première partie de force croissante et une seconde de force uniforme f par unité de longueur, représenté sur la figure C.3.

Pour calculer la déflexion engendrée par cette force, on peut superposer les deux déflexions correspondants aux deux portions du profil. D'une part, δ_1 résulte d'une force croissante linéaire sur une portion $[0; l_1]$ et s'exprime donc de la façon suivante :

$$\delta_1 = \frac{11fl_1^4}{120EI} \tag{C.15}$$

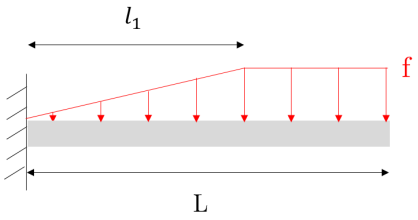


FIGURE C.3 – Profil de force appliqué au cylindre dans le cadre du chapitre 3, avec une force croissante puis uniforme.

Et la déflexion δ_2 résulte d'une force uniforme sur une portion $[l_1; L]$, et s'écrit :

$$\delta_2 = \frac{f}{6EI}(\frac{3L^4}{4} - Ll_1^3 + \frac{l_1^4}{4}) \tag{C.16}$$

On obtient finalement la déflexion totale :

$$\delta = \delta_1 + \delta_2 = \frac{f}{EI}(\frac{L^4}{8} - \frac{Ll_1^3}{6} + \frac{2l_1^4}{15}) \tag{C.17}$$

ANNEXE D

ANALYSE D'IMAGES POUR CROISSANCE SINUSOÏDALE

D.1 Interface substrat-agar

Les différentes étapes de l'analyse des images de microscopie obtenues à l'interface entre l'agar et un substrat sont représentées sur la figure D.1. Dans un premier temps, une macro Fiji nous permet d'effectuer un pré-traitement de l'image (soustraction du background, ajustement du contraste, binarisation de l'image etc) et d'en obtenir un *skeleton*, c'est-à-dire de réduire chaque filament à une seule ligne de pixels (figure D.1b). Ensuite, grâce à la fonction *analyze particles*, les objets au delà d'une certaine taille, correspondant alors aux filaments, sont repérés (c) et enregistrés individuellement (d). Il faut noter toutefois que dans un certain nombre de cas, le filament n'est pas unique, car comme on le voit sur la figure D.1, il n'est pas rare d'avoir des filaments qui se touchent. Dans ce cas, l'image enregistrée contient cet ensemble d'hyphes.

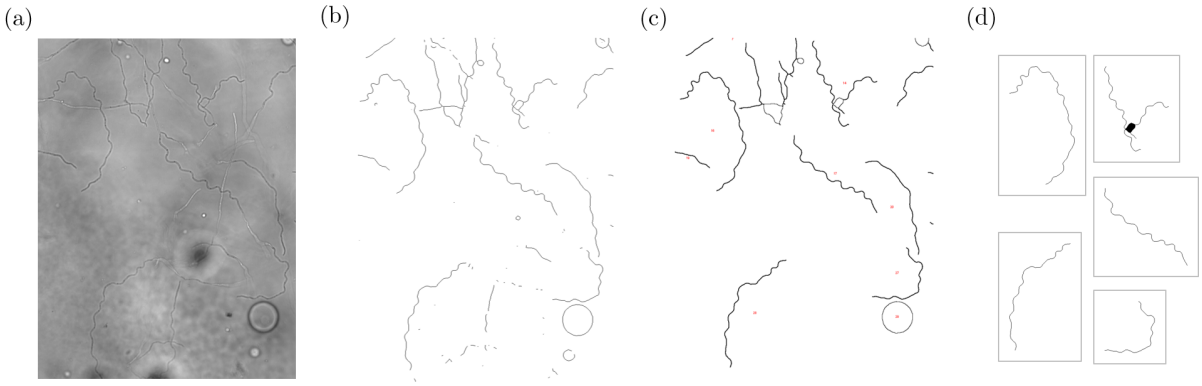


FIGURE D.1 – Traitement des images obtenues à l'interface entre l'agar et le substrat. (a) Image initiale de microscopie en champ clair. (b) Image obtenue après soustraction du background, ajustement du contraste, de la luminosité, du seuil pour la binarisation et utilisation des fonctions de Fiji pour réduire le bruit, puis 'skeletonize' (c) La fonction 'analyse particles' permet ensuite de repérer les filaments individuels et d'éliminer les petits objets en fixant un seuil. (d) Chacune des particules détectées est alors enregistrée de façon individuelle.

La deuxième étape permet de prendre en compte ce problème et consiste à trier ces filaments, afin de permettre ensuite une mesure automatisée des amplitudes, longueurs d'onde et courbures de chaque hyphe. Ces mesures avec Matlab nécessitent une direction globale de l'hyphe selon l'axe des abscisses (pour éviter que la fonction ait 2 valeurs différentes pour une même abscisse). Les trajectoires obtenues doivent donc être "redressées".

Plusieurs situations peuvent se présenter et sont représentées sur la figure D.2. Si le filament a une direction globale rectiligne, il suffit d'effectuer une rotation (a). Si ce n'est pas le cas, alors le plugin *straighten* de Fiji est utilisé en traçant manuellement la trajectoire globale (b). En effectuant cette opération, on réalise que les distances entre les sommets ne sont pas exactement conservées, mais on considérera que le résultat final obtenu ici rend plus compte de la réalité des oscillations auxquelles on s'intéresse, en s'affranchissant des larges changements de direction. Enfin, dans le cas où plusieurs hyphes sont sur la même image, l'opération mentionnée précédemment est effectuée sur chaque filament indépendamment (c).

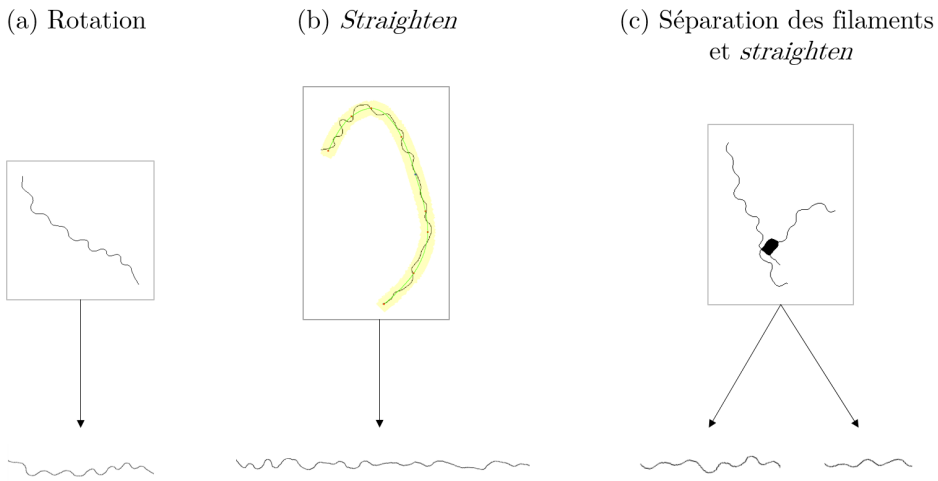


FIGURE D.2 – Exemple des différents cas de filaments obtenus et les réponses apportées. (a) Un filament ayant une direction globale rectiligne doit simplement être subir une rotation. (b) Un filament globalement courbé doit être redressé à l'aide d'une intervention manuelle et du plugin 'Straighten' de Fiji. (c) Le cas de filaments qui se touchent doit également être traité manuellement.

En dessous d'une amplitude moyenne d'un filament inférieure à un seuil fixé, il est alors considéré comme droit.

D.2 Dans les puces microfluidiques

L'analyse d'images au sein des microcanaux des puces se révèle plus difficile car contrairement au cas de l'agar, les filaments ne sont pas les seuls objets visibles sur les images, mais les canaux le sont aussi. Une tentative d'analyse automatisée a également été effectuée. Pour cela, une image des canaux avant la croissance de l'hyphe est soustraite à celle contenant l'hyphe afin d'éliminer les parois. Il faut préalablement aligner très exactement la position des différentes images pour que les canaux se superposent parfaitement, à l'aide du plugin 'Template matching'. L'image

est ensuite améliorée (*dilate*,*remove outliers*...) pour obtenir un filament complètement noir. De la même façon que précédemment, on peut alors obtenir son squelette. Notons également que cela peut être effectué pour chaque image d'un time lapse, ce qui permet d'obtenir aussi automatiquement la vitesse de croissance de l'hyphe.

Cependant, il est très fréquent d'avoir plusieurs hyphes dans le même canal, ce que cette technique ne permet pas de prendre en compte. Ce problème combiné au fait qu'une intervention manuelle est tout de même nécessaire par cette méthode, et qu'elle génère assez régulièrement des erreurs nous a poussé à obtenir finalement les squelettes des filaments de façon manuelle.

ANNEXE E

CYLINDRE SOUS CONFINEMENT

On s'intéresse ici à la déformation des hyphes dans les microcanaux de hauteur h inférieure à leur diamètre. Cela induit un changement de forme du cylindre, comme on le voit sur la figure E.1 qui donne lieu à une mesure de diamètre erronée. Le diamètre apparent $D_{apparent}$ que l'on mesure à partir des images de microscopie en vue de dessus, ne correspond pas au diamètre réel de l'hyphe.

On fait ici l'hypothèse d'une conservation du rayon de courbure r de l'hyphe. Les différents paramètres utilisés par la suite sont indiqués sur la figure E.1.

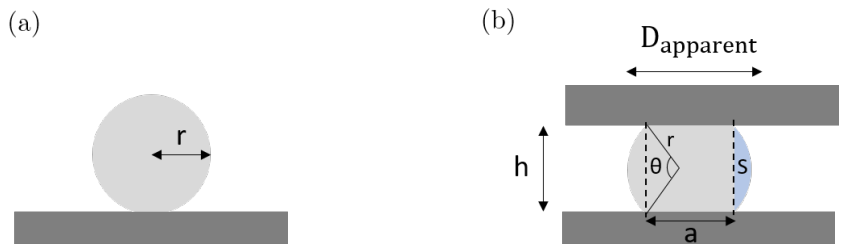


FIGURE E.1 – Représentation schématique d'une coupe transversale d'une hyphe (a) sans aucun confinement, avec un rayon r et (b) sous confinement dans un canal de hauteur h.

La géométrie du segment circulaire de surface S situé de part et d'autre nous donne :

$$\theta = 2 \arcsin\left(\frac{h}{2r}\right) \tag{E.1}$$

L'égalité des longueurs s'écrit :

$$a = D_{apparent} - 2r\cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \tag{E.2}$$

En considérant que la surface d'une coupe transversale reste constante entre le cylindre confinée et le cylindre non confinée :

$$A = \pi r^2 = 2S + ah = r^2(\theta - \sin\theta) + ah \tag{E.3}$$

En connaissant h et $D_{apparent}$ et avec l'expression de θ de l'équation E.1, on peut résoudre ce système de deux équations E.2 et E.3 afin de déterminer r le rayon réel du filament non confiné et a la longueur de contact avec la paroi.

On peut alors tracer le diamètre réel en fonction du diamètre apparent pour les deux hauteurs utilisées dans nos expériences (h=1 µm et h=1.5 µm).

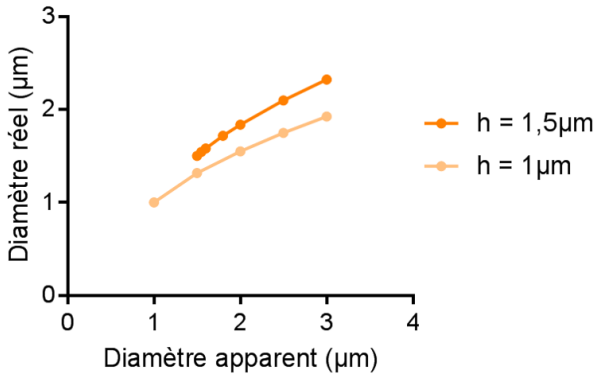


FIGURE E.2 – Diamètre réel d'une hyphe en fonction de son diamètre apparent pour les situations de confinement dans les microcanaux de hauteur 1 et 1,5 µm.

BIBLIOGRAPHIE

[1] D. L. Hawksworth and R. Lücking, "Fungal Diversity Revisited : 2.2 to 3.8 Million Species," *Microbiology Spectrum*, vol. 5, no. 4, 2017.

[2] M. C. Fisher, D. A. Henk, C. J. Briggs, J. S. Brownstein, L. C. Madoff, S. L. McCraw, and S. J. Gurr, "Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health," *Nature*, vol. 484, no. 7393, pp. 186–194, 2012.

[3] F. Bongomin, S. Gago, R. O. Oladele, and D. W. Denning, "Global and multi-national prevalence of fungal diseases - estimate precision," *Journal of Fungi*, vol. 3, no. 4, 2017.

[4] G. D. Brown, D. W. Denning, N. A. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea, and T. C. White, "Hidden killers : Human fungal infections," *Science Translational Medicine*, vol. 4, no. 165, 2012.

[5] M. A. Pfaller and D. J. Diekema, "Epidemiology of invasive candidiasis : A persistent public health problem," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 20, no. 1, pp. 133–163, 2007.

[6] M. Kneale, J. S. Bartholomew, E. Davies, and D. W. Denning, "Global access to antifungal therapy and its variable cost," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 71, no. 12, pp. 3599–3606, 2016.

[7] M. A. Pfaller and D. J. Diekema, "Epidemiology of invasive mycoses in North America," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 36, no. 1, pp. 1–53, 2010.

[8] G. Moran, D. Coleman, and D. Sullivan, "An introduction to the medically important *Candida* species," in *Candida and Candidiasis, Second Edition*, pp. 11–25, 2012.

[9] H. Wisplinghoff, T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond, "Nosocomial bloodstream infections in US hospitals : Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study," *Clinical Infectious Diseases*, no. 39, pp. 309–17, 2004.

[10] K. Satoh, K. Makimura, Y. Hasumi, Y. Nishiyama, K. Uchida, and H. Yamaguchi, "*Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital," *Microbiology and Immunology*, vol. 53, no. 1, pp. 41–44, 2009.

[11] A. Chowdhary, C. Sharma, and J. F. Meis, "*Candida auris* : A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally," *PLoS Pathogens*, vol. 13, no. 5, pp. 1–10, 2017.

[12] M. Whiteway and U. Oberholzer, "*Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 7, no. 4, pp. 350–357, 2004.

[13] P. Sudbery, N. Gow, and J. Berman, "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*," *Trends in Microbiology*, vol. 12, no. 7, pp. 317–324, 2004.

[14] L. A. Merson-Davies and F. C. Odds, "A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*," *Microbiology*, vol. 135, no. 11, pp. 3143–3152, 1989.

[15] M. B. Lohse and A. D. Johnson, "White-opaque switching in *Candida albicans*," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 12, no. 6, pp. 650–654, 2009.

[16] P. Staib and J. Morschhäuser, "Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* - An enigmatic developmental programme," *Mycoses*, vol. 50, no. 1, pp. 1–12, 2007.

[17] C. L. Taschdjian, J. J. Burchall, and P. J. Kozinn, "Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes," *A.M.A. Journal of Diseases of Children*, vol. 99, no. 2, pp. 212–215, 1960.

[18] N. Simonetti, V. Strippoli, and A. Cassone, "Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*," *Nature*, vol. 250, pp. 344–346, 1974.

[19] D. Mardon, E. Balish, and A. W. Phillips, "Control of dimorphism in a biochemical variant of *Candida albicans*.," *Journal of Bacteriology*, vol. 100, no. 2, pp. 701–707, 1969.

[20] J. Buffo, M. A. Herman, and D. R. Soll, "A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*," *Mycopathologia*, vol. 85, no. 1-2, pp. 21–30, 1984.

[21] J. M. Hornby, E. C. Jensen, A. D. Lisec, J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, K. W. Nickerson, J. J. Tasto, and P. Dussault, "Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol," *Applied and environmental microbiology*, vol. 67, no. 7, pp. 2982–2992, 2001.

[22] B. Enjalbert and M. Whiteway, "Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth," *Society*, vol. 4, no. 7, pp. 1203–1210, 2005.

[23] J. M. Hornby, R. Dumitru, and K. W. Nickerson, "High phosphate (up to 600 mM) induces pseudohyphal development in five wild type *Candida albicans*," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 56, no. 1, pp. 119–124, 2004.

[24] F. M. Klis, C. G. de Koster, and S. Brul, "Cell wall-related bionumbers and bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*," *Eukaryotic Cell*, vol. 13, no. 1, pp. 2–9, 2014.

[25] N. A. R. Gow, F. L. van de Veerdonk, A. J. P. Brown, and M. G. Netea, "*Candida albicans* morphogenesis and host defence : discriminating invasion from colonization," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 10, no. 2, pp. 112–122, 2011.

[26] C. Munro and M. L. Richard, "The Cell Wall : Glycoproteins, Remodeling, and Regulation," in *Candida and Candidiasis, Second Edition*, pp. 197–223, 2012.

[27] I. V. Ene, A. K. Adya, S. Wehmeier, A. C. Brand, D. M. Maccallum, N. A. R. Gow, and A. J. P. Brown, "Host carbon sources modulate cell wall architecture , drug resistance and virulence in a fungal pathogen," *Cellular Microbiology*, vol. 14, no. 9, pp. 1319–1335, 2012.

[28] R. R. Lew, "How does a hypha grow ? The biophysics of pressurized growth in fungi," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9, no. 7, pp. 509–518, 2011.

[29] P. E. Sudbery, "Growth of *Candida albicans* hyphae," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9, no. 10, pp. 737–748, 2011.

[30] S. Bartnicki-Garcia, C. E. Bracker, G. Gierz, R. López-Franco, and H. Lu, "Mapping the growth of fungal hyphae : Orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor," *Biophysical Journal*, vol. 79, no. 5, pp. 2382–2390, 2000.

[31] E. Sánchez-León, J. Verdín, M. Freitag, R. W. Roberson, S. Bartnicki-Garcia, and M. Riquelme, "Traffic of chitin synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and developing septa in hyphae of *Neurospora crassa* : Actin dependence and evidence of distinct microvesicle populations," *Eukaryotic Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 683–695, 2011.

[32] A. Weiner, F. Orange, S. Lacas-Gervais, K. Rechav, V. Ghugtyal, M. Bassilana, and R. A. Arkowitz, "On-site secretory vesicle delivery drives filamentous growth in the fungal pathogen *Candida albicans*," *Cellular Microbiology*, vol. 21, jan 2019.

[33] A. Virag and S. D. Harris, "The Spitzenkörper : a molecular perspective," *Mycological Research*, vol. 110, no. 1, pp. 4–13, 2006.

[34] S. Bartnicki-Garcia, "Hyphal tip growth outstanding questions," *Molecular Biology of Fungal Development*, pp. 1–25, 2002.

[35] M. Riquelme, "Tip Growth in Filamentous Fungi : A Road Trip to the Apex," *Annual Review of Microbiology*, vol. 67, no. 1, pp. 587–609, 2013.

[36] L. A. Jones and P. E. Sudbery, "Spitzenkörper, exocyst, and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties," *Eukaryotic Cell*, vol. 9, no. 10, pp. 1455–1465, 2010.

[37] S. Bartnicki-Garcia, D. D. Bartnicki, G. Gierz, R. López-Franco, and C. E. Bracker, "Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha : A test of the hyphoid model," *Experimental Mycology*, vol. 19, no. 2, pp. 153–159, 1995.

[38] M. Riquelme, C. G. Reynaga-Peña, G. Gierz, and S. Bartnicki-García, "What determines growth direction in fungal hyphae ?," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 24, no. 1-2, pp. 101–109, 1998.

[39] G. D. Wright, J. Arlt, W. C. Poon, and N. D. Read, "Optical tweezer micromanipulation of filamentous fungi," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 44, no. 1, pp. 1–13, 2007.

[40] C. E. Bracker, D. J. Murphy, and R. Lopez-Franco, "Laser beam micromanipulation of cell morphogenesis in growing fungal hyphae," *Functional Imaging of Optical Manipulation of Living Cells. Proceedings of SPIE.*, vol. 2983, no. 1996, pp. 67–80, 1997.

[41] J. H. Lipschutz and K. E. Mostov, "Exocytosis : the many masters of the exocyst," *Current Biology*, vol. 12, no. 6, pp. 212–214, 2002.

[42] H. Crampin, "*Candida albicans* hyphae have a Spitzenkörper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae," *Journal of Cell Science*, vol. 118, no. 13, pp. 2935–2947, 2005.

[43] A. Brand, K. Lee, V. Veses, and N. A. Gow, "Calcium homeostasis is required for contact-dependent helical and sinusoidal tip growth in *Candida albicans* hyphae," *Molecular Microbiology*, vol. 71, no. 5, pp. 1155–1164, 2009.

[44] M. Woo, K. Lee, and K. Song, "MYO2 is not essential for viability, but is required for polarized growth and dimorphic switches in *Candida albicans*," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 218, no. 1, pp. 195–202, 2003.

[45] N. Takeshita, R. Manck, N. Grün, S. H. de Vega, and R. Fischer, "Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 20, pp. 34–41, 2014.

[46] Rida Padmashree C.G., A. Nishikawa, G. Y. Won, and N. Dean, "Yeast-to-Hyphal transition triggers formin-dependent Golgi localization to the growing tip in *Candida albicans*," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17, no. October, pp. 4364–4378, 2006.

[47] S. D. Harris, "Branching of fungal hyphae : regulation, mechanisms and comparison with other branching systems," *Mycologia*, vol. 100, no. 6, pp. 823–832, 2008.

[48] M. Riquelme and S. Bartnicki-Garcia, "Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 41, no. 9, pp. 842–851, 2004.

[49] S. D. Harris, "Branching of fungal hyphae : Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems," *Mycologia*, vol. 100, no. 6, pp. 823–832, 2008.

[50] A. Trinci, "The duplication cycle and vegetative development in moulds," in *The Filamentous Fungi III*, pp. p132–163, 1978.

[51] A. S. Gladfelter, "Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 4, no. 3, pp. 223–229, 2006.

[52] C. J. Barelle, E. A. Bohula, S. J. Kron, D. Wessels, D. R. Soll, A. Schäfer, A. J. P. Brown, and N. A. R. Gow, "Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*," *Eukaryotic Cell*, vol. 2, no. 3, pp. 398–410, 2003.

[53] V. Veses, A. Richards, and N. A. R. Gow, "Vacuole inheritance regulates cell size and branching frequency of *Candida albicans* hyphae," *Molecular Microbiology*, vol. 71, no. 2, pp. 505–519, 2009.

[54] A. Richards, V. Veses, and N. A. Gow, "Vacuole dynamics in fungi," *Fungal Biology Reviews*, vol. 24, no. 3-4, pp. 93–105, 2010.

[55] H.-j. Lo, J. R. Ko, B. Didomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G. R. Fink, "Non-filamentous *C. albicans* mutants are avirulent," *Cell*, vol. 90, pp. 939–949, 1997.

[56] S. P. Saville, A. L. Lazzell, C. Monteagudo, and J. L. Lopez-ribot, "Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection," *Eukaryotic Cell*, vol. 2, no. 5, pp. 1053–1060, 2003.

[57] B. G. Seman, J. L. Moore, A. K. Scherer, B. A. Blair, S. Manandhar, J. M. Jones, and R. T. Wheeler, "Yeast and Filaments Have Specialized, Independent Activities in a Zebrafish Model of *Candida albicans* Infection," *Infection and Immunity*, vol. 86, no. 10, pp. 1–16, 2018.

[58] S. A. Nikou, N. Kichik, R. Brown, N. O. Ponde, J. Ho, J. R. Naglik, and J. P. Richardson, "*Candida albicans* interactions with mucosal surfaces during health and disease," *Pathogens*, vol. 8, no. 2, pp. 1–23, 2019.

[59] Q. T. Phan, C. L. Myers, Y. Fu, D. C. Sheppard, M. R. Yeaman, W. H. Welch, A. S. Ibrahim, J. E. Edwards, and S. G. Filler, "Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells," *PLoS Biology*, vol. 5, no. 3, pp. 0543–0557, 2007.

[60] C. Murciano, D. L. Moyes, M. Runglall, P. Tobouti, A. Islam, L. L. Hoyer, and J. R. Naglik, "Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) proteins in human oral epithelial cell interactions," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, pp. 1–9, 2012.

[61] F. Dalle, B. Wächtler, C. L'Ollivier, G. Holland, N. Bannert, D. Wilson, C. Labruère, A. Bonnin, and B. Hube, "Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes," *Cellular Microbiology*, vol. 12, no. 2, pp. 248–271, 2010.

[62] M. Swidergall and S. G. Filler, "Oropharyngeal candidiasis : fungal invasion and epithelial cell responses," *PLoS Pathogens*, vol. 13, no. 1, pp. 1–7, 2017.

[63] Y. Liu and S. G. Filler, "*Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin," *Eukaryotic Cell*, vol. 10, no. 2, pp. 168–173, 2011.

[64] D. D. Thomson, S. Wehmeier, F. J. Byfield, P. A. Janmey, D. Caballero-Lima, A. Crossley, and A. C. Brand, "Contact-induced apical asymmetry drives the thigmotropic responses of *Candida albicans* hyphae," *Cellular Microbiology*, vol. 17, no. 3, pp. 342–354, 2015.

[65] M. Schaller, C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube, "Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*," *Mycoses*, vol. 48, no. 6, pp. 365–377, 2005.

[66] J. Naglik, A. Albrecht, O. Bader, and B. Hube, "*Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions," *Cellular Microbiology*, vol. 6, no. 10, pp. 915–926, 2004.

[67] C. C. Villar, H. Kashleva, C. J. Nobile, A. P. Mitchell, and A. Dongari-Bagtzoglou, "Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p," *Infection and Immunity*, vol. 75, no. 5, pp. 2126–2135, 2007.

[68] D. L. Moyes, D. Wilson, J. P. Richardson, S. Mogavero, S. X. Tang, J. Wernecke, S. Höfs, R. L. Gratacap, J. Robbins, M. Runglall, C. Murciano, M. Blagojevic, S. Thavaraj, T. M. Förster, B. Hebecker, L. Kasper, G. Vizcay, S. I. Iancu, N. Kichik, A. Häder, O. Kurzai,

T. Luo, T. Krüger, O. Kniemeyer, E. Cota, O. Bader, R. T. Wheeler, T. Gutsmann, B. Hube, and J. R. Naglik, "Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection," *Nature*, vol. 532, no. 7597, pp. 64–68, 2016.

[69] S. Allert, T. M. Förster, C.-m. Svensson, J. P. Richardson, T. Pawlik, B. Hebecker, S. Rudolphi, M. Juraschitz, M. Schaller, M. Blagojevic, J. Morschhäuser, T. Figge, I. D. Jacobsen, J. R. Naglik, L. Kasper, and S. Mogavero, "*Candida albicans*-induced epithelial damage mediates translocation through intestinal barriers," *American Society for Microbiology*, vol. 9, no. 3, pp. 1–20, 2018.

[70] J. S. Finkel and A. P. Mitchell, "Biofilm formation in *Candida albicans*," in *Candida and Candidiasis, Second Edition*, pp. 299–315, 2012.

[71] M. D. LaFleur, C. A. Kumamoto, and K. Lewis, "*Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 11, pp. 3839–3846, 2006.

[72] I. Denega, C. D'Enfert, and S. Bachellier-Bassi, "*Candida albicans* biofilms are generally devoid of persister cells," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 63, no. 5, pp. 1–9, 2019.

[73] I. V. Ene, S. C. Cheng, M. G. Netea, and A. J. Brown, "Growth of *Candida albicans* cells on the physiologically relevant carbon source lactate affects their recognition and phagocytosis by immune cells," *Infection and Immunity*, vol. 81, no. 1, pp. 238–248, 2013.

[74] J. M. Bain, J. Louw, L. E. Lewis, B. Okai, C. A. Walls, E. R. Ballou, L. A. Walker, D. Reid, C. A. Munro, A. J. Brown, G. D. Brown, N. A. Gow, and L. P. Erwig, "*Candida albicans* hypha formation and mannan masking of β-Glucan inhibit macrophage phagosome maturation," *mBio*, vol. 5, no. 6, pp. 1–17, 2014.

[75] L. P. Erwig and N. A. Gow, "Interactions of fungal pathogens with phagocytes," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, no. 3, pp. 163–176, 2016.

[76] J. M. Bain, L. E. Lewis, B. Okai, J. Quinn, N. A. Gow, and L. P. Erwig, "Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 49, no. 9, pp. 677–678, 2012.

[77] A. J. Brown, S. Budge, D. Kaloriti, A. Tillmann, M. D. Jacobsen, Z. Yin, I. V. Ene, I. Bohovych, D. Sandai, S. Kastora, J. Potrykus, E. R. Ballou, D. S. Childers, S. Shahana, and M. D. Leach, "Stress adaptation in a pathogenic fungus," *Journal of Experimental Biology*, vol. 217, no. 1, pp. 144–155, 2014.

[78] R. Alonso-Monge, F. Navarro-García, G. Molero, R. Diez-Orejas, M. Gustin, J. Pla, M. Sánchez, and C. Nombela, "Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*," *Journal of Bacteriology*, vol. 181, no. 10, pp. 3058–3068, 1999.

[79] S. Höfs, S. Mogavero, and B. Hube, "Interaction of *Candida albicans* with host cells : virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota," *Journal of Microbiology*, vol. 54, no. 3, pp. 149–169, 2016.

[80] J. E. Nett and D. Andes, "Antifungals : drug class, mechanisms of action, pharmacokinetics/pharmacodynamics, drug-drug interactions, toxicity, and clinical use," in *Candida and Candidiasis, Second Edition*, 2012.

[81] T. Vila, J. A. Romo, C. G. Pierce, S. F. McHardy, S. P. Saville, and J. L. Lopez-Ribot, "Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development," *Virulence*, vol. 8, no. 2, pp. 150–158, 2017.

[82] A. R. Waldorf and A. Polak, "Mechanisms of action of 5-fluorocytosine," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 23, no. 1, pp. 79–85, 1983.

[83] S. C. Terry, J. H. Herman, and J. B. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, 1979.

[84] A. Manz, D. J. Harrison, E. M. Verpoorte, J. C. Fettinger, A. Paulus, H. Lüdi, and H. M. Widmer, "Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. Capillary electrophoresis on a chip," *Journal of Chromatography A*, vol. 593, no. 1-2, pp. 253–258, 1992.

[85] M. A. Burns, B. N. Johnson, S. N. Brahmasandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo, and D. T. Burke, "An integrated nanoliter DNA analysis device," *Science*, vol. 282, no. 5388, pp. 484–487, 1998.

[86] A. K. P. Tay, B. L. Khoo, and M. E. Warkiani, "Microfluidics for fast and frugal diagnosis of malaria, sepsis, and HIV/AIDS," *Frugal Innovation in Bioengineering for the Detection of Infectious Diseases*, pp. 57–75, 2018.

[87] S. Y. Teh, R. Lin, L. H. Hung, and A. P. Lee, "Droplet microfluidics," *Lab on a Chip*, vol. 8, no. 2, pp. 198–220, 2008.

[88] M. T. Guo, A. Rotem, J. A. Heyman, and D. A. Weitz, "Droplet microfluidics for high-throughput biological assays," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 12, pp. 2146–2155, 2012.

[89] Z. Wang, R. Samanipour, K. I. Koo, and K. Kim, "Organ-on-a-chip platforms for drug delivery and cell characterization : A review," *Sensors and Materials*, vol. 27, no. 6, pp. 487–506, 2015.

[90] X. Wang, Q. Sun, and J. Pei, "Microfluidic-based 3D engineered microvascular networks and their applications in vascularized microtumor models," *Micromachines*, vol. 9, no. 10, pp. 1–26, 2018.

[91] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, and D. E. Ingber, "Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 12, pp. 2165–2174, 2012.

[92] T. Beneyton, I. P. M. Wijaya, P. Postros, M. Najah, P. Leblond, A. Couvent, E. Mayot, A. D. Griffiths, and A. Drevelle, "High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 27223, 2016.

[93] H. Jiang, Z. Xu, M. R. Aluru, and L. Dong, "Plant chip for high-throughput phenotyping of *Arabidopsis*," *Lab Chip*, vol. 14, no. 7, pp. 1281–1293, 2014.

[94] G. Grossmann, W.-J. Guo, D. W. Ehrhardt, W. B. Frommer, R. V. Sit, S. R. Quake, and M. Meier, "The RootChip : An Integrated Microfluidic Chip for Plant Science," *The Plant Cell*, vol. 23, no. 12, pp. 4234–4240, 2011.

[95] X. Wang, Z. Liu, and Y. Pang, "Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems," *RSC Advances*, vol. 7, no. 48, pp. 29966–29984, 2017.

[96] M. Horade, M. M. Kanaoka, M. Kuzuya, T. Higashiyama, and N. Kaji, "A microfluidic device for quantitative analysis of chemoattraction in plants," *RSC Advances*, vol. 3, no. 44, p. 22301, 2013.

[97] A. S. Nezhad, M. Packirisamy, and A. Geitmann, "Dynamic, high precision targeting of growth modulating agents is able to trigger pollen tube growth reorientation," *Plant Journal*, vol. 80, no. 1, pp. 185–195, 2014.

[98] A. M. Taylor, M. Blurton-Jones, S. W. Rhee, D. H. Cribbs, C. W. Cotman, and N. L. Jeon, "A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport," *Nature Methods*, vol. 2, no. 8, pp. 599–605, 2005.

[99] Y. Y. Huang, W. Zhou, K. J. Hsia, E. Menard, J. U. Park, J. A. Rogers, and A. G. Alleyne, "Stamp collapse in soft lithography," *Langmuir*, vol. 21, no. 17, pp. 8058–8068, 2005.

[100] N. R. Glass, R. Tjeung, P. Chan, L. Y. Yeo, and J. R. Friend, "Organosilane deposition for microfluidic applications," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 3, pp. 1–7, 2011.

[101] A. Yamada, J.-L. Viovy, C. Villard, and S. Descroix, "Rapid and easy fabrication of glass-bottom culture dishes for long-term live cell imaging," *Chips and Tips*, 2017.

[102] C. Cadart, E. Zlotek-Zlotkiewicz, L. Venkova, O. Thouvenin, V. Racine, M. Le Berre, S. Monnier, and M. Piel, "Fluorescence eXclusion Measurement of volume in live cells," in *Methods in Cell Biology*, vol. 139, pp. 103–120, 2017.

[103] S. Kobel, A. Valero, J. Latt, P. Renaud, and M. Lutolf, "Optimization of microfluidic single cell trapping for long-term on-chip culture," *Lab on a Chip*, vol. 10, no. 7, p. 857, 2010.

[104] A. Ahmad Khalili, M. Ahmad, M. Takeuchi, M. Nakajima, Y. Hasegawa, and R. Mohamed Zulkifli, "A microfluidic device for hydrodynamic trapping and manipulation platform of a single biological cell," *Applied Sciences*, vol. 6, no. 2, p. 40, 2016.

[105] T. Geng, E. L. Bredeweg, C. J. Szymanski, B. Liu, S. E. Baker, G. Orr, J. E. Evans, and R. T. Kelly, "Compartmentalized microchannel array for high-throughput analysis of single cell polarized growth and dynamics," *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, p. 16111, 2015.

[106] A. Sanati Nezhad, M. Ghanbari, C. G. Agudelo, M. Naghavi, M. Packirisamy, R. B. Bhat, and A. Geitmann, "Optimization of flow assisted entrapment of pollen grains in a microfluidic platform for tip growth analysis," *Biomedical Microdevices*, vol. 16, no. 1, pp. 23–33, 2014.

[107] C. G. Agudelo, A. S. Nezhad, M. Ghanbari, M. Naghavi, M. Packirisamy, and A. Geitmann, "TipChip : A modular, MEMS-based platform for experimentation and phenotyping of tip-growing cells," *Plant Journal*, vol. 73, no. 6, pp. 1057–1068, 2013.

[108] M. Ghanbari, A. S. Nezhad, C. G. Agudelo, M. Packirisamy, and A. Geitmann, "Microfluidic positioning of pollen grains in lab-on-a-chip for single cell analysis," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 117, no. 4, pp. 504–511, 2014.

[109] H. Bruus, "Theoretical microfluidics," 2006.

[110] B. Mao, "Dynamics of agar-based gels in contact with solid surfaces : Gelation , Adhesion, Drying and Formulation," 2017.

[111] F. C. Odds, A. J. Brown, and N. A. Gow, "*Candida albicans* genome sequence : A platform for genomics in the absence of genetics," *Genome Biology*, vol. 5, no. 7, pp. 5–7, 2004.

[112] F. C. Odds, L. V. Nuffel, and N. A. Gow, "Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host," *Microbiology*, vol. 146, no. 8, pp. 1881–1889, 2000.

[113] K. R. Finley and J. Berman, "Microtubules in *Candida albicans* hyphae drive nuclear dynamics and connect cell cycle progression to morphogenesis," *Eukaryotic cell*, vol. 4, no. 10, pp. 697–711, 2005.

[114] E. Moreno-Ruiz, G. Ortu, P. W. de Groot, F. Cottier, C. Loussert, M. C. Prévost, C. de Koster, F. M. Klis, S. Goyard, and C. D'Enfert, "The GPI-modified proteins Pga59 and Pga62 of *Candida albicans* are required for cell wall integrity," *Microbiology*, vol. 155, no. 6, pp. 2004–2020, 2009.

[115] P. D. Cantero and J. F. Ernst, "Damage to the glycoshield activates *PMT*-directed O-mannosylation via the Msb2-Cek1 pathway in *Candida albicans*," *Molecular Microbiology*, vol. 80, no. 3, pp. 715–725, 2011.

[116] C. J. Nobile, D. R. Andes, J. E. Nett, F. J. Smith, F. Yue, Q. T. Phan, J. E. Edwards, S. G. Filler, and A. P. Mitchell, "Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo," *PLoS Pathogens*, vol. 2, no. 7, pp. 0636–0649, 2006.

[117] "Polymerase chain reaction - Wikimedia Commons."

[118] S. Kawai, W. Hashimoto, and K. Murata, "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi," *Bioengineered Bugs*, no. December, pp. 395–403, 2010.

[119] W. Fonzi and M. Irwin, "Isogenic strain construction and gene targeting in *Candida dubliniensis*," *Genetics*, vol. 134, pp. 717–728, 1993.

[120] J. Berman and P. E. Sudbery, "*Candida albicans* : A molecular revolution built on lessons from budding yeast," *Nature Reviews Genetics*, vol. 3, no. 12, pp. 918–932, 2002.

[121] M. Gerami-Nejad, J. Berman, and C. A. Gale, "Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*," *Yeast*, vol. 18, no. 9, pp. 859–864, 2001.

[122] Q. R. Xu, L. Yan, Q. Z. Lv, M. Zhou, X. Sui, Y. B. Cao, and Y. Y. Jiang, "Molecular genetic techniques for gene manipulation in *Candida albicans*," *Virulence*, vol. 5, no. 4, pp. 507–520, 2014.

[123] V. K. Vyas, M. I. Barrasa, and G. R. Fink, "A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families," *Molecular Genetics*, no. April, pp. 1–6, 2015.

[124] K. Min, Y. Ichikawa, C. A. Woolford, and A. P. Mitchell, "*Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System," *mSphere*, vol. 1, no. 3, pp. 1–9, 2016.

[125] M. Minsky, "Microscopy Apparatus," p. 5, 1957.

[126] J. P. Mills, L. Qie, M. Dao, C. T. Lim, and S. Suresh, "Nonlinear elastic and viscoelastic deformation of the human red blood cell with optical tweezers.," *Mechanics & chemistry of Biosystems : MCB*, vol. 1, no. 3, pp. 169–180, 2004.

[127] A. Geitmann, "Experimental approaches used to quantify physical parameters at cellular and subcellular levels," *American Journal of Botany*, vol. 93, no. 10, pp. 1380–1390, 2006.

[128] P. Milani, M. Gholamirad, J. Traas, A. Arnéodo, A. Boudaoud, F. Argoul, and O. Hamant, "*In vivo* analysis of local wall stiffness at the shoot apical meristem in *Arabidopsis* using atomic force microscopy," *Plant Journal*, vol. 67, no. 6, pp. 1116–1123, 2011.

[129] C. Formosa, M. Schiavone, H. Martin-Yken, J. M. François, R. E. Duval, and E. Dague, "Nanoscale effects of caspofungin against two yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 57, no. 8, pp. 3498–3506, 2013.

[130] F. Quilès, I. Accoceberry, C. Couzigou, G. Francius, T. Noël, and S. El-Kirat-Chatel, "AFM combined to ATR-FTIR reveals *Candida* cell wall changes under caspofungin treatment," *Nanoscale*, 2017.

[131] L. Zhao, D. Schaefer, H. Xu, S. Modi, W. LaCourse, and M. Marten, "Elastic properties of *Aspergillus nidulans* studied with atomic force microscopy," *2005 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2005 Technical Proceedings*, pp. 243–245, 2005.

[132] N. Shamsudhin, N. Laeubli, H. B. Atakan, H. Vogler, C. Hu, W. Haeberle, A. Sebastian, U. Grossniklaus, and B. J. Nelson, "Massively parallelized pollen tube guidance and mechanical measurements on a lab-on-a-chip platform," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 12, pp. 1–15, 2016.

[133] E. Dague, R. Bitar, H. Ranchon, F. Durand, and J. M. Fran, "An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture," *Yeast*, vol. 27, no. July, pp. 673–684, 2010.

[134] H. Ma, L. A. Snook, S. G. Kaminskyj, and T. E. Dahms, "Surface ultrastructure and elasticity in growing tips and mature regions of *Aspergillus* hyphae describe wall maturation," *Microbiology*, vol. 151, no. 11, pp. 3679–3688, 2005.

[135] A. Geitmann, W. McConnaughey, I. Lang-Pauluzzi, V. E. Franklin-Tong, and A. M. C. Emons, "Cytomechanical properties of *Papaver* pollen tubes are altered after self-incompatibility challenge," *Biophysical Journal*, vol. 86, no. 5, pp. 3314–3323, 2004.

[136] M. Bastmeyer, H. B. Deising, and C. Bechinger, "Force exertion in fungal infection," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, vol. 31, pp. 321–41, 2002.

[137] R. Howard and N. A. Gow, "The Mycota VIII : Biology of the Fungal Cell," in *The Mycota*, 2007.

[138] N. P. Money, C. M. Davis, and J. P. Ravishankar, "Biomechanical evidence for convergent evolution of the invasive growth process among fungi and oomycete water molds," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 41, no. 9, pp. 872–876, 2004.

[139] J. P. Ravishankar, C. M. Davis, D. J. Davis, E. MacDonald, S. D. Makselan, L. Millward, and N. P. Money, "Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 34, no. 3, pp. 167–175, 2001.

[140] C. Bechinger, K. F. Giebel, M. Schnell, P. Leiderer, H. B. Deising, and M. Bastmeyer, "Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus," *Science*, vol. 285, no. 5435, pp. 1896–1899, 1999.

[141] A. D. Tomos and R. A. Leigh, "THE PRESSURE PROBE : A Versatile Tool in Plant Cell Physiology," *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 50, no. 1, pp. 447–472, 1999.

[142] B. González-Bermúdez, Q. Li, G. V. Guinea, M. A. Peñalva, and G. R. Plaza, "Probing the effect of tip pressure on fungal growth : Application to *Aspergillus nidulans*," *Physical Review E*, vol. 96, no. 2, pp. 1–9, 2017.

[143] A. Tayagui, Y. Sun, D. Collings, A. Garrill, and V. Nock, "An elastomeric micropillar platform for the study of protrusive forces in hyphal invasion," *Lab Chip*, 2017.

[144] N. Minc, A. Boudaoud, and F. Chang, "Mechanical Forces of Fission Yeast Growth," *Current Biology*, vol. 19, no. 13, pp. 1096–1101, 2009.

[145] C. Puerner, N. Kukhaleishvili, D. Thomson, S. Schaub, X. Noblin, A. Seminara, M. Bassilana, and R. A. Arkowitz, "Mechanical force-induced morphology changes in a human fungal pathogen," *BMC Biology*, pp. 1–21, 2020.

[146] A. Sanati Nezhad, M. Naghavi, M. Packirisamy, R. Bhat, and A. Geitmann, "Quantification of cellular penetrative forces using lab-on-a-chip technology and finite element modeling.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 20, pp. 8093–8098, 2013.

[147] N. P. Money, "The fungal dining habit : a biomechanical perspective," *Mycologist*, vol. 18, no. 2, pp. 71–76, 2004.

[148] C. X. Wang, L. Wang, and C. R. Thomas, "Modelling the mechanical properties of single suspension-cultured tomato cells," *Annals of Botany*, vol. 93, no. 4, pp. 443–453, 2004.

[149] A. E. Smith, Z. Zhang, C. R. Thomas, K. E. Moxham, and A. P. Middelberg, "The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 18, pp. 9871–9874, 2000.

[150] C. Hu, G. Munglani, H. Vogler, T. Ndinyanka Fabrice, N. Shamsudhin, F. K. Wittel, C. Ringli, U. Grossniklaus, H. J. Herrmann, and B. J. Nelson, "Characterization of size-dependent mechanical properties of tip-growing cells using a lab-on-chip device," *Lab Chip*, vol. 17, no. 1, pp. 82–90, 2017.

[151] A. S. Nezhad, M. Naghavi, M. Packirisamy, R. Bhat, and A. Geitmann, "Quantification of the Young's modulus of the primary plant cell wall using Bending-Lab-On-Chip (BLOC)," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 13, p. 2599, 2013.

[152] A. Amir, F. Babaeipour, D. B. McIntosh, D. R. Nelson, and S. Jun, "Bending forces plastically deform growing bacterial cell walls," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 16, pp. 5778–5783, 2014.

[153] Y. Caspi, "Deformation of filamentous *Escherichia coli* cells in a microfluidic device : A new technique to study cell mechanics," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, 2014.

[154] P. H. Wu, D. R. B. Aroush, A. Asnacios, W. C. Chen, M. E. Dokukin, B. L. Doss, P. Durand-Smet, A. Ekpenyong, J. Guck, N. V. Guz, P. A. Janmey, J. S. Lee, N. M. Moore, A. Ott, Y. C. Poh, R. Ros, M. Sander, I. Sokolov, J. R. Staunton, N. Wang, G. Whyte, and D. Wirtz, "A comparison of methods to assess cell mechanical properties," *Nature Methods*, vol. 15, no. 7, 2018.

[155] D. Vella, A. Ajdari, A. Vaziri, and A. Boudaoud, "The indentation of pressurized elastic shells : From polymeric capsules to yeast cells," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 9, no. 68, pp. 448–455, 2012.

[156] P. Wang, L. Robert, J. Pelletier, W. L. Dang, F. Taddei, and A. Wright, "Robust Growth of *Escherichia coli*," *Current Biology*, vol. 20, no. 12, pp. 1099–1103, 2010.

[157] S. Demming, C. Lesche, H. Schmolke, C. P. Klages, and S. Büttgenbach, "Characterization of long-term stability of hydrophilized PEG-grafted PDMS within different media for biotechnological and pharmaceutical applications," *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, vol. 208, no. 6, pp. 1301–1307, 2011.

[158] K. M. Kovach, J. R. Capadona, A. S. Gupta, and J. A. Potkay, "The effects of PEG-based surface modification of PDMS microchannels on long-term hemocompatibility," *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, vol. 102, no. 12, pp. 4195–4205, 2014.

[159] G. Schubert, "Viscous flow near a cusped corner," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 27, no. 4, pp. 647–656, 1967.

[160] J. M. Gere and S. Timoshenko, *Mechanics of Materials.* 1997.

[161] D. Dendukuri, S. S. Gu, D. C. Pregibon, T. A. Hatton, and P. S. Doyle, "Stop-flow lithography in a microfluidic device," *Lab on a Chip*, vol. 7, no. 7, p. 818, 2007.

[162] D. Dendukuri, P. Panda, R. Haghgooie, J. M. Kim, T. A. Hatton, and P. S. Doyle, "Modeling of oxygen-inhibited free radical photopolymerization in a PDMS microfluidic device," *Macromolecules*, vol. 41, no. 22, pp. 8547–8556, 2008.

[163] D. A. Markov, E. M. Lillie, S. P. Garbett, and L. J. Mccawley, "Variation in diffusion of gases through PDMS due to plasma surface treatment and storage conditions," *Biomed Microdevices*, vol. 16, pp. 91–96, 2014.

[164] C. Nam, J. Yoon, S. A. Ryu, C. H. Choi, and H. Lee, "Water and oil insoluble PEGDA-based microcapsule : biocompatible and multicomponent encapsulation," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 10, no. 47, pp. 40366–40371, 2018.

[165] J. T. Leito, A. J. Ligtenberg, K. Nazmi, and E. C. Veerman, "Identification of salivary components that induce transition of hyphae to yeast in *Candida albicans*," *FEMS Yeast Research*, vol. 9, no. 7, pp. 1102–1110, 2009.

[166] G. Vediyappan, V. Dumontet, F. Pelissier, and C. D'Enfert, "Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*," *PLoS ONE*, 2014.

[167] A. K. Lindsay, A. Deveau, A. E. Piispanen, and D. A. Hogan, "Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*," *Eukaryotic Cell*, vol. 11, no. 10, pp. 1219–1225, 2012.

[168] J. Shen, L. E. Cowen, A. M. Griffin, L. Chan, and J. R. Köhler, "The *Candida albicans* pescadillo homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 52, pp. 20918–20923, 2008.

[169] A. D. Bowen, F. A. Davidson, R. Keatch, and G. M. Gadd, "Induction of contour sensing in *Aspergillus niger* by stress and its relevance to fungal growth mechanics and hyphal tip structure," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 44, no. 6, pp. 484–491, 2007.

[170] M. Held, O. Kaspar, C. Edwards, and D. V. Nicolau, "Intracellular mechanisms of fungal space searching in microenvironments," *PNAS*, vol. 116, no. 27, pp. 13543–13552, 2019.

[171] A. Brand, S. Shanks, V. M. S. Duncan, M. Yang, K. Mackenzie, and N. A. R. Gow, "Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism," *Current Biology*, vol. 17, no. 4, pp. 347–352, 2007.

[172] A. Davidson and P. Gregory, "The spiral hyphae of *Trichophyton*," *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 21, no. 1-2, pp. 98–113, 1937.

[173] A. Trinci, P. Saunders, R. Gosrani, and K. Campbell, "Spiral growth of mycelial and reproductive hyphae," *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 73, no. 2, pp. 283–292, 1979.

[174] J. Sherwood-Higham, W. Y. Zhu, C. A. Devine, G. W. Gooday, N. A. Gow, and D. W. Gregory, "Helical growth of hyphae of *Candida albicans*," *Medical Mycology*, vol. 32, no. 6, pp. 437–445, 1994.

[175] A. Brand, A. Vacharaksa, C. Bendel, J. Norton, P. Haynes, M. Henry-Stanley, C. Wells, K. Ross, N. A. Gow, and C. A. Gale, "An internal polarity landmark is important for

externally induced hyphal behaviors in *Candida albicans*," *Eukaryotic Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 712–720, 2008.

[176] N. Takeshita, Y. Higashitsuji, S. Konzack, and R. Fischer, "Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 19, no. January, pp. 339–351, 2008.

[177] M. Riquelme, G. Gierz, and S. Bartnicki-García, "Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*," *Microbiology*, vol. 146, no. 7, pp. 1743–1752, 2000.

[178] Q. Wu, T. M. Sandrock, B. G. Turgeon, O. C. Yoder, S. G. Wirsel, and J. R. Aist, "A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 89–101, 1998.

[179] A. Brand, S. Shanks, V. M. S. Duncan, M. Yang, K. Mackenzie, and N. A. R. Gow, "Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism," *Current Biology*, vol. 17, no. 4, pp. 347–352, 2007.

[180] D. Halachmi and Y. Eilam, "Elevated cytosolic free Ca2+ concentrations and massive Ca2+ accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking *PMR1*, a homolog of Ca2+-ATPase," *FEBS Letters*, vol. 392, no. 2, pp. 194–200, 1996.

[181] S. Bates, D. M. MacCallum, G. Bertram, C. A. Munro, H. B. Hughes, E. T. Buurman, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow, "*Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca2+/Mn 2+-ATPase, is required for glycosylation and virulence," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 24, pp. 23408–23415, 2005.

[182] A. F. Ram, M. Arentshorst, R. A. Damveld, P. A. VanKuyk, F. M. Klis, and C. A. van den Hondel, "The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine : Fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall," *Microbiology*, vol. 150, no. 10, pp. 3315–3326, 2004.

[183] M. C. Almeida and A. C. Brand, "Thigmo Responses : The Fungal Sense of Touch," *The Fungal Kingdom*, pp. 487–507, 2017.

[184] R. B. Simmons, J. R. Buffington, M. Ward, L. A. Wilson, and D. G. Ahearn, "Morphology and ultrastructure of fungi in extended-wear soft contact lenses," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 24, no. 1, pp. 21–25, 1986.

[185] G. E. Piérard, C. Piérard-Franchimont, and P. Quatresooz, "Fungal thigmotropism in onychomycosis and in a clear hydrogel pad model," *Dermatology*, vol. 215, no. 2, pp. 107–113, 2007.

[186] H. C. Hoch, R. C. Staples, B. Whitehead, J. Comeau, and E. D. Wolf, "Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*," *Science*, vol. 235, no. 4796, pp. 1659–1662, 1987.

[187] C. A. Kumamoto, "Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 9, pp. 667–673, 2008.

[188] T. Geng, E. L. Bredeweg, C. J. Szymanski, B. Liu, S. E. Baker, G. Orr, J. E. Evans, and R. T. Kelly, "Compartmentalized microchannel array for high-throughput analysis of single cell polarized growth and dynamics," *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, p. 16111, 2015.

[189] M. Held, C. Edwards, and D. V. Nicolau, "Probing the growth dynamics of *Neurospora crassa* with microfluidic structures," *Fungal Biology*, vol. 115, no. 6, pp. 493–505, 2011.

[190] F. Migliaccio and S. Piconese, "Spiralizations and tropisms in *Arabidopsis* roots," *Trends in Plant Science*, vol. 6, no. 12, pp. 561–565, 2001.

[191] M. V. Thompson and N. M. Holbrook, "Root-Gel Interactions and the Root Waving Behavior of *Arabidopsis*," *Plant Physiology*, vol. 135, no. 3, pp. 1822–1837, 2004.

[192] C. S. Buer, J. Masle, and G. O. Wasteneys, "Growth conditions modulate root-wave phenotypes in *Arabidopsis*," *Plant and Cell Physiology*, vol. 41, no. 10, pp. 1164–1170, 2000.

[193] M. Stolarz, "Circumnutation as a visible plant action and reaction Physiological, cellular and molecular basis for circumnutations," *Plant Signaling and Behavior*, vol. 4, no. 5, pp. 380–387, 2009.

[194] F. Migliaccio, P. Tassone, and A. Fortunati, "Circumnutation as an autonomous root movement in plants," *American Journal of Botany*, vol. 100, no. 1, pp. 4–13, 2013.

[195] M. Nakano, R. Samejima, and H. Iida, "Mechanosensitive channel candidate MCA2 is involved in touch-induced root responses in *Arabidopsis*," *Frontiers in Plant Science*, vol. 5, no. AUG, pp. 1–11, 2014.

[196] S. Berri, J. H. Boyle, M. Tassieri, I. A. Hope, and N. Cohen, "Forward locomotion of the nematode *C. elegans* is achieved through modulation of a single gait," *HFSP Journal*, vol. 3, no. 3, pp. 1–9, 2009.

[197] F. Lebois, P. Sauvage, C. Py, O. Cardoso, B. Ladoux, P. Hersen, and J. M. Di Meglio, "Locomotion control of *Caenorhabditis elegans* through confinement," *Biophysical Journal*, vol. 102, no. 12, pp. 2791–2798, 2012.

[198] S. Park, H. Hwang, S. W. Nam, F. Martinez, R. H. Austin, and W. S. Ryu, "Enhanced *Caenorhabditis elegans* locomotion in a structured microfluidic environment," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 6, pp. 1–5, 2008.

[199] C. Fang-Yen, M. Wyart, J. Xie, R. Kawai, T. Kodger, S. Chen, Q. Wen, and A. D. Samuel, "Biomechanical analysis of gait adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 47, pp. 20323–20328, 2010.

[200] J. G. Wessels, "Cell wall synthesis in apical hyphal growth," *International Review of Cytology*, vol. 104, no. C, pp. 37–79, 1986.

[201] E. Román, F. Cottier, J. F. Ernst, and J. Pla, "Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*," *Eukaryotic Cell*, vol. 8, no. 8, pp. 1235–1249, 2009.

[202] S. Puri, R. Kumar, S. Chadha, S. Tati, H. R. Conti, B. Hube, P. J. Cullen, and M. Edgerton, "Secreted aspartic protease cleavage of *Candida albicans* Msb2 activates Cek1 MAPK signaling affecting biofilm formation and oropharyngeal candidiasis.," *PLoS one*, vol. 7, no. 11, 2012.

[203] M. Delarue, G. Poterewicz, O. Hoxha, J. Choi, W. Yoo, J. Kayser, L. Holt, and O. Hallatschek, "SCWISh network is essential for survival under mechanical pressure," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114, no. 51, pp. 13465–13470, 2017.

[204] K. K. Lee, D. M. MacCallum, M. D. Jacobsen, L. A. Walker, F. C. Odds, N. A. Gow, and C. A. Munro, "Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance *in vivo*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 1, pp. 208–217, 2012.

[205] M. Schaechter, J. P. Williamson, J. R. Hood, and A. Koch, "Growth, cell and nuclear divisions in some bacteria.," *Journal of General Microbiology*, vol. 29, pp. 421–434, 1962.

[206] "Schéma récapitulatif des principales phases du cycle cellulaire - Cycle cellulaire — Wikipédia."

[207] S. Jun and S. Taheri-Araghi, "Cell-size maintenance : Universal strategy revealed," *Trends in Microbiology*, vol. 23, no. 1, pp. 4–6, 2015.

[208] S. Taheri-Araghi, S. Bradde, J. T. Sauls, N. S. Hill, P. A. Levin, J. Paulsson, M. Vergassola, and S. Jun, "Cell-size control and homeostasis in bacteria," *Current Biology*, vol. 25, no. 3, pp. 385–391, 2015.

[209] J. J. Turner, J. C. Ewald, and J. M. Skotheim, "Cell size control in yeast," *Current Biology*, vol. 22, no. 9, pp. R350–R359, 2012.

[210] S. D. Talia, J. M. Skotheim, J. M. Bean, E. D. Siggia, and F. R. Cross, "The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle," *Nature*, vol. 448, no. 7156, pp. 947–951, 2007.

[211] I. Soifer, L. Robert, and A. Amir, "Single-cell analysis of growth in budding yeast and bacteria reveals a common size regulation strategy," *Current Biology*, vol. 26, no. 3, pp. 356–361, 2016.

[212] G. Facchetti, F. Chang, and M. Howard, "Controlling cell size through sizer mechanisms," *Current Opinion in Systems Biology*, vol. 5, pp. 86–92, 2017.

[213] K. M. Schmoller, J. J. Turner, M. Kõivomägi, and J. M. Skotheim, "Dilution of the cell cycle inhibitor Whi5 controls budding-yeast cell size," *Nature*, vol. 526, no. 7572, pp. 268–272, 2015.

[214] K. M. Schmoller and J. M. Skotheim, "The biosynthetic basis of cell size control," *Trends in Cell Biology*, vol. 25, no. 12, pp. 793–802, 2015.

[215] M. Delarue, D. Weissman, and O. Hallatschek, "A simple molecular mechanism explains multiple patterns of cell-size regulation," *PLoS one*, vol. 12, no. 8, p. e0182633, 2017.

[216] S. D. H. Tom D. Wolkow1 and J. E. Hamer, "Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis," *Journal of Cell Science*, vol. 2188, pp. 2179–2188, 1996.

[217] J. Berman, "Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, no. 6, pp. 595–601, 2006.

[218] I. Hazan, S.-B. Marisa, and H. Liu, "Hyphal elongation Is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 2170–2179, 2002.

[219] D. D. Thomson, J. Berman, and A. C. Brand, "High frame-rate resolution of cell division during *Candida albicans* filamentation," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 88, pp. 54–58, 2016.

[220] F. Ferrezuelo, N. Colomina, A. Palmisano, E. Garí, C. Gallego, A. Csikász-Nagy, and M. Aldea, "The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation," *Nature Communications*, vol. 3, 2012.

[221] M. J. Sevilla and F. C. Odds, "Development of *Candida albicans* hyphae in different growth media–variations in growth rates, cell dimensions and timing of morphogenetic events.," *Journal of General Microbiology*, vol. 132, no. 11, pp. 3083–3088, 1986.

[222] N. A. R. Gow and G. W. Gooday, "Growth kinetics and morphology of colonies of the filamentous form of *Candida albicans*," *Journal of General Microbiology*, vol. 128, no. 9, pp. 2187–2194, 1982.

[223] C. Cadart, S. Monnier, J. Grilli, P. J. Sáez, N. Srivastava, R. Attia, E. Terriac, B. Baum, M. Cosentino-Lagomarsino, and M. Piel, "Size control in mammalian cells involves modulation of both growth rate and cell cycle duration," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, 2018.

[224] A. I. Goranov, M. Cook, M. Ricicova, G. Ben-Ari, C. Gonzalez, C. Hansen, M. Tyers, and A. Amon, "The rate of cell growth is governed by cell cycle stage," *Genes and Development*, vol. 23, no. 12, pp. 1408–1422, 2009.

[225] E. B. Gómez and S. L. Forsburg, "Analysis of *S. pombe* cell cycle," *Cell Cycle Checkpoint Control Protocols*, vol. 241, pp. 93–111, 2004.

[226] C. Bachewich, A. Mantel, and M. Whiteway, "Cell cycle arrest during S or M phase generates polarized growth via distinct signals in *Candida albicans*," *Molecular Microbiology*, vol. 57, no. 4, pp. 942–959, 2005.

RÉSUMÉ

Le pathogène opportuniste *Candida albicans* est l'un des plus importants champignons d'un point de vue clinique, responsable d'infections mucosales chez les individus sains ainsi que de sévères infections chez les patients immunodéficients. Une propriété remarquable de *C. albicans* est sa capacité à croître sous différentes morphologies, de la levure bourgeonnante ronde à de longs filaments appelés hyphes. Les mécanismes d'invasion fongique sont toujours faiblement compris, mais ils impliquent à la fois la pénétration des hyphes à travers les barrières épithéliales et la dissémination des levures dans la circulation sanguine. Ainsi les propriétés mécaniques de ce champignon semblent cruciales à sa virulence, et également sa capacité à percevoir son environnement et à répondre à diverses contraintes.
Nous avons développé un dispositif microfluidique pour la mesure du module de flexion des hyphes. Les levures sont positionnées à l'entrée de microcanaux puis croissent sous forme hyphale. Un flux est ensuite appliqué de façon à courber les filaments, et le module de flexion ainsi que le module de Young sont calculés à partir de la déflexion. Nous avons trouvé que le module de la paroi des hyphes était d'une dizaine de micronewtons.
En utilisant des puces microfluidiques, nous pouvons orienter les hyphes dans des microcanaux de différentes tailles afin d'étudier leur comportement sous confinement. De façon étonnante, un confinement 2D peut déclencher une transition d'une croissance rectiligne à une croissance sinusoïdale. Les caractéristiques de ces trajectoires spécifiques et les différentes conditions expérimentales permettant leur observation ont été étudiées. Des hélices en 3D ont également été observées dans des gels d'agar ou en relâchant la contrainte 2D. Plusieurs pistes pour expliquer ce comportement sont explorées comme la position d'un complexe de polarité à l'apex, le Spitzenkörper.
Enfin, la progression du cycle cellulaire chez les hyphes est particulièrement intéressante et très bien régulée, mais pourtant très peu étudiée par rapport à celle des levures à fission ou bourgeonnantes. L'utilisation de microcanaux et de différents marquages (noyau, septum, microtubule) permet un suivi précis des différents événements du cycle, ce qui mène à une meilleure compréhension de la régulation ainsi que de la dynamique du cycle cellulaire chez les hyphes.

MOTS CLÉS

C. albicans, microfluidique, biophysique, croissance hyphale.

ABSTRACT

The opportunistic pathogen *Candida albicans* is one of the most important fungi from a clinical point of view, responsible for mucosal diseases in healthy individuals up to severe infections in immunocompromised patients. A striking property of *C. albicans* is its ability to grow under distinct morphological forms, from the spherical budding yeast form to long filaments called hyphae. The mechanisms of fungal invasion are still poorly understood, but they involve both penetration of hyphae through the epithelial barriers and dissemination of yeasts in the bloodstream. Therefore, the mechanical properties of the fungus appear crucial to its virulence, as well as its ability to sense its environment and respond to various constraints.
We developed a microfluidic device for the measurement of bending rigidity of hyphae. Yeasts are placed in front of microchannels and grow as hyphae. Then a flow is applied to bend the filaments and the bending rigidity and Young's modulus are computed from their deflection. We have found that the modulus of the hyphal cell wall ranges around ten of micronewtons.
By using microfluidic devices, we can implement guidance of hyphae into microchannels of various sizes in order to probe their behavior under confinement. Surprisingly, a 2D confinement can trigger a switch from a normal straight growth to a sinusoidal growth. Studies of the characteristics of these specific trajectories and of different experimental conditions triggering them have been carried out. Helices in 3D have also been observed either in agar gel or immediately upon release of the 2D confinement. Several leads to explain this behavior are explored such as the position at the tip of the Spitzenkörper, a polarity complex in hyphae.
Finally, the cell cycle progression in hyphae is quite interesting and very well regulated, but nevertheless poorly studied compared to the one in budding or fission yeasts. The use of microchannels and of various stainings (nucleus, septum, microtubules) allow a precise monitoring of the different events of the cycle, leading to a better understanding of the regulation and dynamics of cell cycle in hyphae.

KEYWORDS

C. albicans, microfluidics, biophysics, hyphal growth.