THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Baptiste ALRIC

Le 15 décembre 2021

Impact des contraintes mécaniques sur la physiologie cellulaire

---

Ecole doctorale : **GEETS - Génie Electrique Electronique,Télécommunications et Santé : du système au nanosystème**

Spécialité : **MicroNano Systèmes**

Unité de recherche :
LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par
Anne-Marie GUE et Morgan DELARUE

Jury

Mme Cendrine Moskalenko, Rapporteure
M. Gilles Charvin, Rapporteur
M. Pascal Hersen, Examinateur
Mme Sylvie Tournier, Examinatrice
M. Liam Holt, Examinateur
M. Morgan Delarue, Directeur de thèse

Résumé

Le « confinement » est un mot qui résonne de manière assez spéciale dans nos oreilles en cette fin d'année 2021. Synonyme de blocage ou de limitation il est devenu incontournable. Cependant si ce terme lorsque qu'il est appliqué aux individus nous est familier, il l'est beaucoup moins lorsque l'on parle de croissance cellulaire. Et pourtant, nous sommes souvent en contact avec des systèmes multicellulaires qui sont confinés par leur environnement. Un exemple emblématique est la croissance des racines sous les routes capables d'endommager celles-ci. Mais nous pouvons retrouver d'autres exemples comme la croissance des tumeurs ou la création de biofilms de certains microbes.

Nous allons dans notre étude nous concentrer sur l'impact de ce confinement spatial sur la physiologie cellulaire. Nous prendrons comme organisme d'étude la levure *S. cerevisiae* couramment utilisée dans les laboratoires de recherche pour sa facilité de manipulation et notre capacité à réaliser des modifications de son génome.

Dans une étude précédente, il a été montré que lorsque l'on place les cellules dans un espace confiné, elles génèrent une pression mécanique en poussant sur leur environnement lors de leur croissance .

Cette observation nous a conduit à étudier les cellules lorsque qu'elles sont soumises à cette pression induite par la croissance. Nous porterons un intérêt particulier à l'évolution des propriétés rhéologique s des cellules sous contrainte, qui peuvent physiquement impacter de nombreux processus biologiques.

Ainsi, avant d'étudier les changements que vont induire les contraintes mécaniques, nous allons définir et caractériser les mouvements de nano-traceurs dans les cellules au travers de simulations et d'observations expérimentales sans contraintes.

Ensuite, nous allons montrer que ce mouvement de traceurs fluorescents dans le cytoplasme est ralenti lorsque les cellules sont confinées. Notre hypothèse est que cette diminution est due à une augmentation de l'encombrement des cellules causée par une augmentation de la concentration en macromolécules.

Cette hypothèse nous amènera à observer la croissance des cellules et à remarquer que celle-ci aussi diminue lorsque les cellules sont spatialement contraintes. Nous constaterons que cette diminution de la croissance est liée à une diminution de la production protéique causée par l'augmentation de l'encombrement.

Si l'augmentation de l'encombrements entraine des limitations dans les mécanismes de croissance et de productions protéiques, nous avons aussi constaté des impacts sur d'autres mécanismes biologiques tels que la séparation de phase ou le métabolisme, qui peuvent spécifiquement altérer la réponse cellulaire.

En conclusion, le confinement des cellules entraine l'émergence d'une pression mécanique causée par la croissance des cellules. Cette pression entraine des changements dans la rhéologie des cellules ce qui induit une diminution de la croissance liée à une diminution du taux de production des protéines. Ce phénomène étant purement biophysique, nous pensons qu'il est possible que les effets de ces variations se retrouvent dans d'autres mécanismes biologiques, et même dans d'autre organismes tels quel les cellules mammifères, les bactéries ou les cellules végétales.

Abstract

"Confinement" is a word that resonates in a rather special way at the end of 2021. Synonymous with constrain or limitation, it is everywhere. However, while this term when applied to individuals is familiar to us , it is much less so when it comes to cell growth. Yet, we are often in contact with multicellular systems confined by their environment. An emblematic example is the growth of roots under roads capable of damaging this road . Other examples such as growth of tumors or the creation of biofilms in certain types of microbes are equally important.

In our study, we will focus on the impact of this confinement on cell physiology. We will use as a model organism the yeast *S. cerevisiae* commonly studied in research laboratories for its ease of handling and our ability to make changes to its genome.

In a previous study, it was shown that when cells are placed in a confined space they generate mechanical pressure by pushing on their environment as they grow .

This observation led us to study cells subjected to this growth-induced pressure, with a particular interest in the modification of the rheological properties of cells, which are able to modulate biochemical reactions.

Before studying the changes induced by mechanical stresses , we will define and characterize movements of tracer particles in cells through simulations and unconstrained experimental observations.

We will then show that the movement of fluorescent tracer particles in the cytoplasm slows down when cells are confined.

Our hypothesis is that this decrease is due to an increase of crowding inside cells caused by an increase in concentration of macromolecules. This hypothesis led us to observe cell growth and to observe a decrease of this growth when cells are spatially constrained. We find that this effect is related to a decrease in protein production caused by increased crowding.

While the increase in crowding leads to limitations in the mechanisms of growth and protein production, we also report impacts on other biological mechanisms such as phase separation or metabolism, which can specifically adapt the cell to confined growth.

Confinement of cells leads to an induction of mechanical pressure caused by cell growth. This pressure causes changes in the rheology of cells, which will induce a decrease in growth associated with a decrease in the rate of amount of proteins producedprotein production.As this phenomenon is purely biophysical, we believe that it is possible that the effects of these variations can be found in other biological processes, and even in other organisms such as mammalian cells, bacteria or plants.

Table des matières

1 Introduction **7**
- 1.1 Description succincte d'une cellule type . . . 8
- 1.2 Les composants des cellules l'encombrent . . . 11
  - 1.2.1 Mesure de l'encombrement dans les cellules . . . 14
  - 1.2.2 Effet de l'encombrement dans les cellules . . . 16
- 1.3 Les cellules proliférant sous confinement déforment leur environnement . . . 17
- 1.4 Impact des contraintes compressives sur les cellules . . . 19
- 1.5 Comment les cellules détectent les contraintes compressives . . . 21
- 1.6 Résumé . . . 23

2 Déplacement dans la cellule : un mouvement limité par les encombrants **25**
- 2.1 Origine et description du mouvement brownien . . . 26
  - 2.1.1 Historique et équations fondamentales . . . 26
  - 2.1.2 Description du déplacement de particule . . . 26
  - 2.1.3 Les mesurables . . . 28
- 2.2 Mouvement des particules dans les cellules . . . 30
  - 2.2.1 Un outil pour mesurer la diffusion dans les cellules : les GEMs . . . 31
  - 2.2.2 Le retour des observables . . . 31
- 2.3 Simulation d'un colloïde de sphère dure . . . 33
  - 2.3.1 Création d'un modèle numérique . . . 34
  - 2.3.2 Validation des simulations . . . 36
  - 2.3.3 Calibration . . . 37
  - 2.3.4 Comparaison de la simulation de sphères dures et des expérimentations . . . 38
- 2.4 Conclusions et perspectives . . . 41

3 Effet du confinement sur l'encombrement dans la cellule **43**
- 3.1 Méthode de mesure et origine de la pression induite par la croissance . . . 44
  - 3.1.1 Pression induite par la croissance dans des puces microfluidiques . . . 44
  - 3.1.2 Définition de la pression osmotique . . . 45
  - 3.1.3 La pression de turgescence : une pression d'origine osmotique . . . 46
  - 3.1.4 Impact de chocs osmotiques sur les cellules . . . 47
- 3.2 La pression induite par la croissance modifie la diffusion dans les cellules . . . 49
  - 3.2.1 Pas de variation du volume cellulaire sous pression, mais une diminution de la diffusion . . . 49
  - 3.2.2 La pression de croissance est liée à une augmentation de la pression interne dans les cellules . . . 50
  - 3.2.3 L'augmentation de l'encombrement est relié à une diminution du volume nucléaire . . . 52
- 3.3 Conclusions et perspectives . . . 54

4 Effet du confinement sur la physiologie cellulaire 57
4.1 Étude de la croissance sous contraintes mécaniques 58
4.1.1 Différence entre croissance et division 58
4.1.2 Méthode de mesure 59
4.2 Étude de l'origine de la diminution de la croissance des cellules confinées 61
4.2.1 Une voie de signalisation qui détecte/contrôle la croissance sous confinement. 61
4.2.2 Une diminution de la production protéique 63
4.2.3 Impact des contraintes compressives sur la production protéique 64
4.3 Modèle de l'impact de la modulation de l'encombrement cellulaire 67
4.3.1 Principe du modèle développé 68
4.3.2 Résultats de ce modèle 69
4.4 Conclusions et perspectives 70
4.4.1 Perspective 70
4.4.2 Conclusion 72

5 Effet du confinement sur d'autre mécanismes biologiques 73
5.1 Métabolisme 74
5.1.1 Principe général 74
5.1.2 Principe de la puce 74
5.1.3 Lien entre encombrement et respiration mitochondriale 76
5.2 Lien entre encombrement et séparation de phase 77
5.2.1 Séparation de phase dans les cellules 77
5.2.2 Un outil pour l'étude de la séparation de phase dans les cellules : SUMO-SIM 78
5.2.3 Séparation de phase et confinement 79
5.2.4 Les *P-bodies* et les granules de stress 80
5.2.5 Impact du confinement sur des mutants de *P-bodies* 84
5.3 Conclusions et perspectives 86
5.3.1 Perspective 86
5.3.2 Conclusion 86

6 Discussion et perspectives générales 87
6.1 Conclusion 88
6.2 Perspective générale 90
6.2.1 Universalité du phénomène? 90
6.3 Conclusion finale 94

7 Matériel et méthodes 95
7.1 Principe des dispositifs microfluidique 96
7.2 Culture cellulaire 99
7.3 Souches utilisées 100
7.4 Fabrication salle blanche 100
7.5 Fabrication Salle bio 105
7.6 Utilisation des puces sous microscopie 106
7.7 Protocole d'utilisation des puces microfluidiques 107
7.8 Analyse d'image 109
7.9 Simulation de sphères dures 112

A Bibliographie 117

B Annexe : article 1 127

C Annexe : article 2 155

Chapitre 1

Introduction

L'année 2019 restera gravée dans l'histoire comme associé à l'une des plus grandes pandémies du monde moderne. Cette grave crise sanitaire a fait réapparaitre le terme de "confinement". Si la définition de ce terme n'est plus à faire tellement il a été présent ces dernières années, et si l'on voit facilement ce qu'est le confinement à l'échelle d'individus voire de la population, on oublie souvent que ce phénomène se retrouve à des échelles bien plus petites tels que l'échelle des cellules. Et pourtant, il existe plusieurs exemples dans la nature dans lesquels les cellules sont obligées de se développer dans des espaces limités en taille, entrainant donc l'apparition de situations de prolifération confinée. Un des exemples le plus représentatif est peut-être la croissance des racines sous les routes ou autres zones goudronnées. Tout le monde a déjà croisé des routes endommagées par ces racines. Cela nous indique que les cellules, ici végétales, sont capables de développer des forces gigantesques pour déformer leur environnement et croitre, même dans des endroits extrêmement solides. Ce phénomène de confinement des cellules, et de génération de forces, est aussi présent dans d'autre exemple tels que les cancers, où les cellules sont contraintes par le tissus cellulaire entourant la tumeur[33] ou dans la formation de biofilms par des bactéries[25]. Avant de

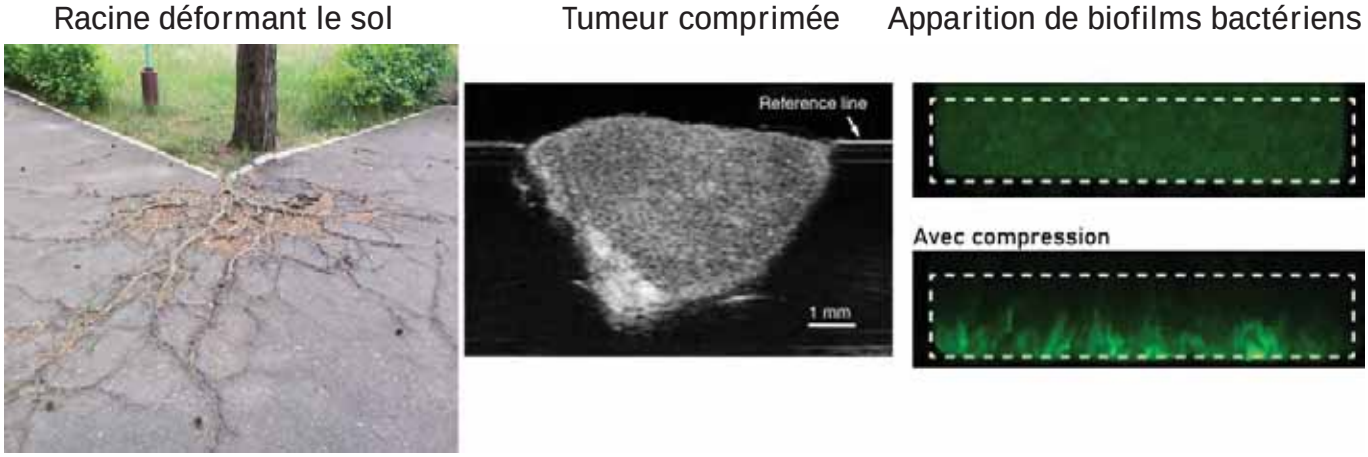


FIGURE 1.1 – a. Racine déformant le sol en béton. b. Image d'une tumeur coupée qui relaxe lors d'un "déconfinement" de la coupe (image issue de l'article "Nia et al,2018"[25]) .c. Image en fluorescence de cellules bactériennes (*E. coli*) formant des biofilms lorsqu'elles subissent une compression. Image issue de l'article "Chu et al,2018"[25]

décrire les contraintes physiques issues de ce confinement et leur impact, nous allons commencer par une description succincte des cellules.

1.1 Description succincte d'une cellule type

Une cellule est l'élément de base de tout organisme. Il existe également des organismes composés d'une seule cellule et pourtant mesurant plusieurs centimètres tels que le "Physarum polycephalum" ou "blob" pour les intimes[34]. Les organismes plus complexes comme le corps humain peuvent quant à eux être composée de centaines de milliers de milliards de cellules[104]. Dans ce cas, les cellules ont des fonctions et des propriétés variées. Celles-ci sont liées aux composants de la cellule que nous allons rapidement présenter.

Composition à une échelle "macro" : mur, membrane, organelle

Les chiffres qui seront donnés dans cette partie concernent principalement la levure *S. cerevisiae*. La cellule est un système fermé, séparé du milieu où elle se trouve par la membrane cellulaire (ou membrane plasmique). Celle-ci est composée principalement de lipides organisés en

bicouche ainsi que de protéines transmembranaires. La membrane est flexible et perméable à certaines molécules. Pour certains types de cellules tels que les plantes ou certains microbes, cette membrane est entourée d'une paroi (ou mur) cellulaire, changeant les propriétés mécaniques de celles-ci. Dans le cas de la levure *S. cerevisiae* l'épaisseur du mur fait qu'il va occuper une partie importante du volume, et représenter ~ 15% du volume total[122]. L'un des éléments les plus importants de la cellule est le noyau. Présent uniquement chez les eucaryotes, il s'agit d'un sous-système dans la cellule séparé du cytoplasme par une enveloppe. C'est dans le noyau qu'est stocké l'ADN et où la transcription de l'ADN en ARN a lieu. Son volume est estimé à $\leq 10\mu m^3$[63], soit environ 15% du volume de la cellule. Ce noyau est structuré, et contient notamment le nucléole, espace dans lequel se situe notamment la synthèse de l'ARN ribosomal, nécessaire à la formation de ces complexes ribo-protéiques que sont les ribosomes[125]. Autour du noyau se retrouve le réticulum endoplasmique, relié à l'enveloppe nucléaire. C'est dans cet organite que va avoir lieu la majorité de la production protéique liée au trafficking. Il occupe ~ 2%[122] du volume total. Viennent ensuite les mitochondries, responsables de la majorité de l'énergie produite par la cellule. Composée de deux membranes séparant deux espaces spécifiques, la mitochondrie utilise des flux de protons créés grâce à des complexes protéiques afin de produire de l'ATP, qui est la molécule organique servant de carburant aux cellules, la libération de l'énergie durant son hydrolyse étant essentielle à de nombreux processus. La mitochondrie possède la capacité de fissionner et de fusionner pour former des réseaux plus ou moins denses afin d'avoir une production optimale et de se protéger d'éventuels stress. Elle ne représente cependant que ~ 1.6% du volume de la cellule[122]. Enfin, le plus gros organite chez la levure est la vacuole. Les lysosomes chez les cellules mammifères ont un rôle similaire. C'est un espace dans lequel les protéines et autres molécules sont dégradées. Chez la levure, la vacuole représente environ ~ 20% du volume[18].

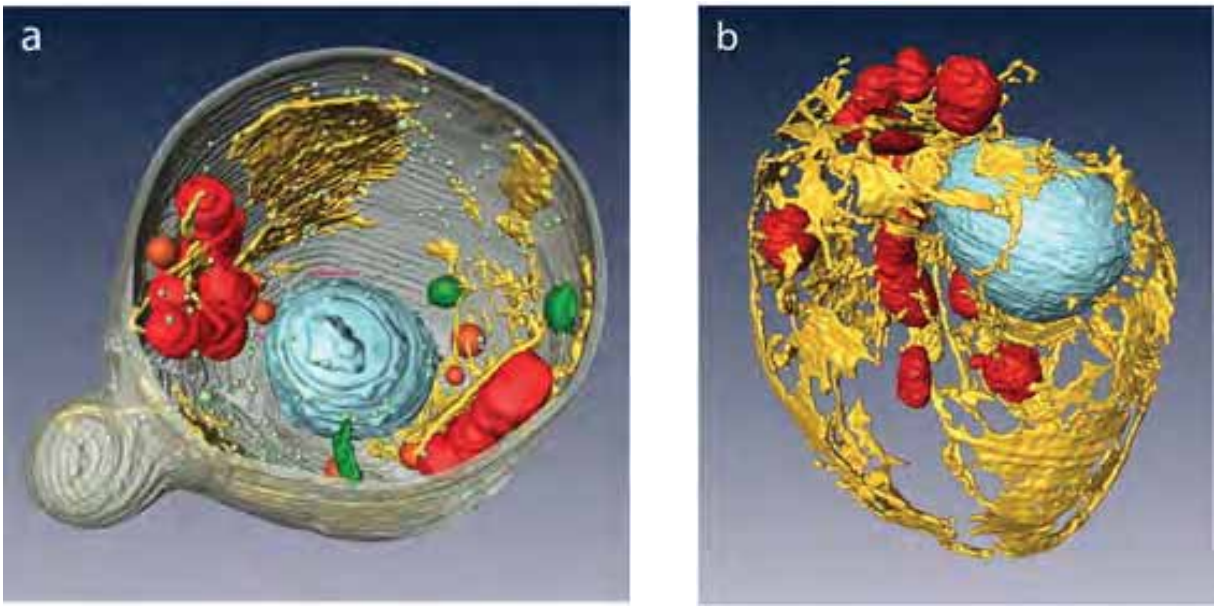


FIGURE 1.2 – Reconstitution en 3D à l'aide de microscopie électronique d'une cellule *S. cerevisiae* avec en jaune le réticulum endoplasmique, en bleu le noyau , en rouge les mitochondries et le mur cellulaire en gris. b. Image précédente sans mur cellulaire avec en jaune le réticulum endoplasmique, en bleu le noyau, en rouge les mitochondries. Ces images sont extraites de l'article de "Dongguang et al., 2018" [122]

Composition à une échelle “micro” : protéines, ribosomes, ARN

Entre ces gros objets que forment les organelles chez les eucaryotes, de plus petit éléments vont être responsables des réactions ayant lieu dans les cellules. Les protéines sont des structures 3D composées d’acides aminées. Elles sont impliquées dans toutes les réactions que cela soit en tant que réactant, produit ou catalyseur. Il est admis que leurs tailles est comprise en 1 et 6 nm[75]. Il existe ainsi des micro-protéines composées seulement de quelques dizaines de bases et, inversement, des protéines formées de complexes multiprotéiques qui peuvent être beaucoup plus grands (plusieurs dizaines de nm). Dans le cas de la levure *S. cerevisiae*, elles représentent jusqu’à un tiers de la masse des cellules [105]. Les protéines sont formées à partir d’ARNm ("Acide ribonucléique messager”). L’ARNm est utilisé pour transcrire les informations codées dans l’ADN. Cette information est transportée jusqu’au cytoplasme pour être traduite en protéines. Étant donnée leur nature variable il est difficile de leur donner une taille précise, mais si nous l’estimons par une sphère effective celle-ci aura un rayon de ∼20 nm [46]. L’ARNm représente ∼ 10% de la masse des cellules[105].

Les ribosomes sont les éléments qui vont permettre la traduction des ARNms en protéines Ces complexes riboprotéiques, composés de protéines et d’ARN ribosomaux, vont former un objet complexe de 25 nm environ[121]. Les ribosomes vont représenter la majeure partie des particules dans les cellules (∼ 20000 par μm^3)[126]), ce qui peut représenter jusqu’à environ 20 à 25 % du volume du cytoplasme, soit une proportion gigantesque.

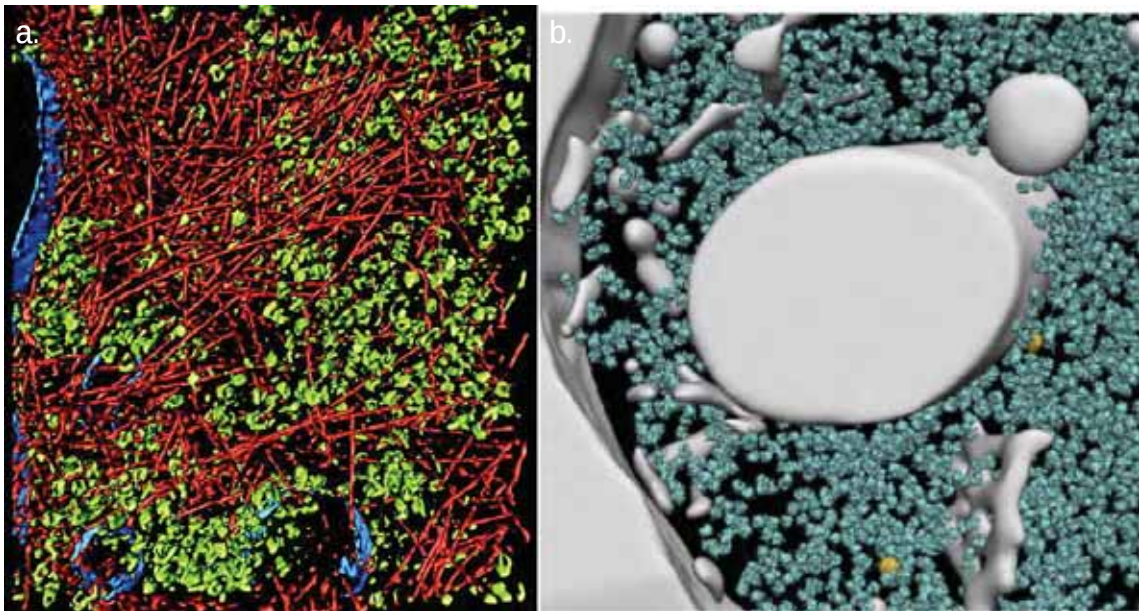


FIGURE 1.3 – a. Visualisation en cryo-ET du réseau d’actine et des encombrants macromoléculaires dans *Dictyostelium* (image issue de l’article de "Medalia et al."[71] b. Visualisation en cryo-ET de l’intérieur d’une cellule. Seuls les ribosomes sont représentés *S. cerevisiae* "Delarue et al.,2018"[30]

Pour conclure sur l’organisation des cellules, nous venons de voir que celle-ci est structurée chez les eucaryotes entre larges objets, remplis de particules de tailles très différentes et de concentrations différentes.

Les différents organismes

Nous venons de décrire l'intérieur d'une levure *S. cerevisiae*. Nous allons brièvement nous intéresser aux différences entre différents organismes. Nous pouvons séparer premièrement les eucaryotes des procaryotes, c'est-à-dire des cellules avec un noyau (mammifères, plantes, levures) et les cellules sans noyau (Bactéries). Chez les eucaryotes, nous pouvons aussi distinguer les cellules faisant partie d'un organisme multicellulaire (mammifère, plante) ou unicellulaire (levure ou microbe en général, bien que ceux-ci forment des structures multicellulaires comme les biofilms). Une des différences entre les cellules mammifères et les plantes provient de leur composition, les plantes possédant (comme les levures) un mur cellulaire qui entoure la membrane plasmique, mais également des chloroplastes impliqués dans la photosynthèse. Il y a enfin de grandes variabilités en taille et en composition au sein d'un même organisme, mais aussi entre eux. Ainsi, les bactéries ont tendance à être plus petites que les levures, elles-mêmes plus petites que les cellules animales et végétales.

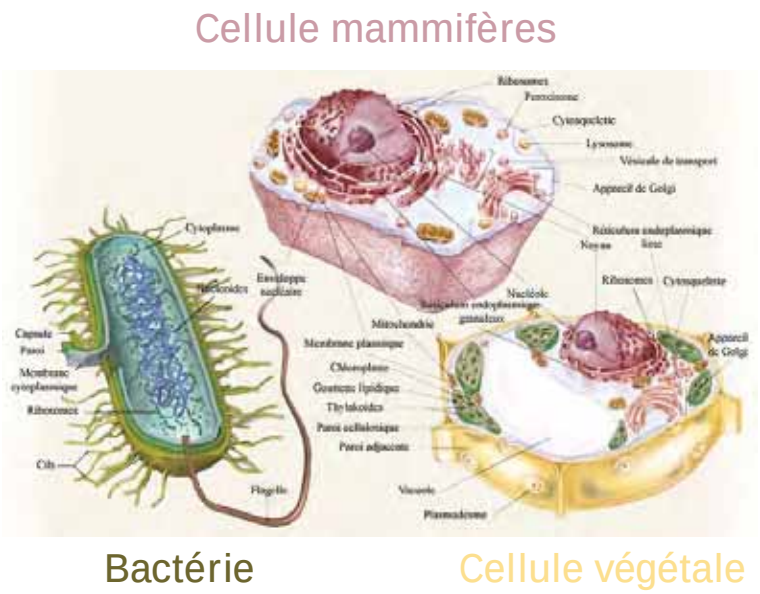


FIGURE 1.4 – Illustration des différents types cellulaires : mammifères, bactéries et végétales

1.2 Les composants des cellules l'encombrent

Depuis quelques années, de nombreuses équipes de recherche ont réalisé, à l'aide de différentes méthodes, des images de l'intérieur des cellules. Une fameuse représentation de l'intérieur de la cellule est la vue d'artiste proposée par David Goodsell, et basée sur des simulations (Fig.1.5.a). Plus récemment, nous pouvons apprécier la superbe image de l'intérieur d'une cellule eucaryote obtenue grâce à plusieurs méthodes (Rayon-X, résonance magnétique nucléaire(RMN), et de la cryo-microscopie électronique) réalisée par Evan Ingersoll et Gael McGill (Fig.1.5.b).

Ces images, et celles de la partie précédente, montrent à quel point les cellules sont encombrées. Il a par exemple été estimé dans le cas de bactéries *E. coli* que les macromolécules telles que les protéines représentaient 40% du volume des cellules [132]. En général, quel que soit l'organisme, ces macromolécules occupent entre 20 et 40% du volume des cellules [41]. Ces macromolécules vont entrainer un encombrement dans les cellules.

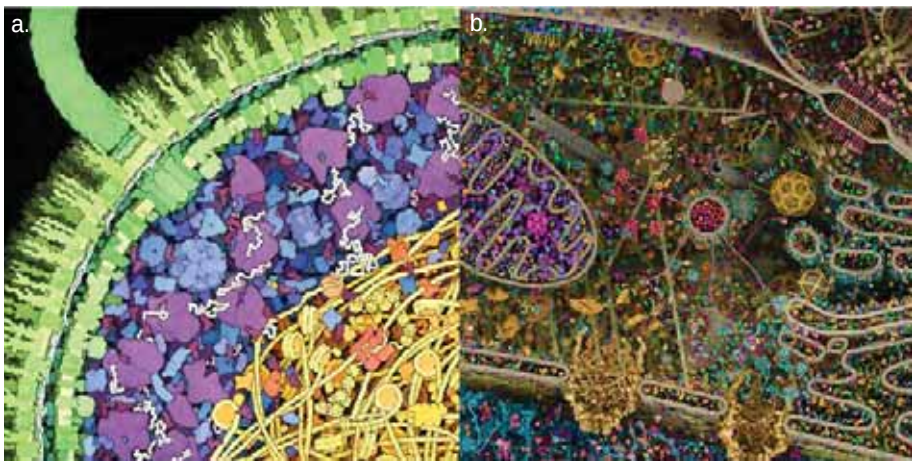


FIGURE 1.5 – a. Vue d'artiste de l'intérieur réalisée par David Goodsell à partir d'images de microscopie électronique. b. Vue de l'intérieur d'une cellule par Evan Ingersoll et Gael McGill, à partir d'images issues d'un ensemble de méthodes complémentaires (Rayon-X, résonance magnétique nucléaire (RMN), et cryo-microscopie électronique)

L'encombrement peut-être défini de plusieurs façons, mais nous allons dans ce manuscrit la définition la plus commune donnée dans l'article de Zhou, Rivas et Minton (trois auteurs particulièrement importants dans le domaine de l'étude de l'encombrement macromoléculaire)[130], qui définissent l'encombrement comme l'influence du volume occupé par des macromolécules inertes (appelé volume d'exclusion) dans une solution contenant d'autre macromolécules pouvant réagir entre elles ou non. Ces auteurs donnent comme exemple les trois cas suivant (1.6, et modélisent l'impact de l'encombrement sur ces réactions (interaction entre deux protéines solubles (1.6.a), entre une protéine soluble et une surface (1.6.b), et sur la conformation de chaines polymériques et l'autoassemblage (1.6.c).

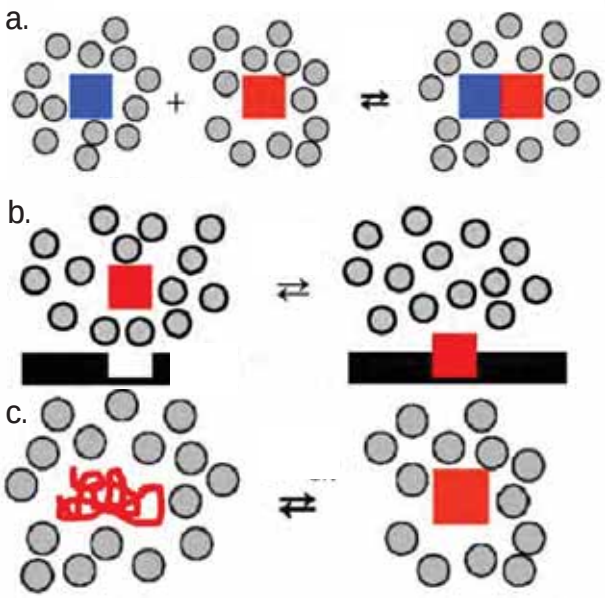


FIGURE 1.6 – Illustration de l'impact du confinement a. Sur la réaction entre deux macromolécules mobiles b. Entre une molécule mobile et un espace immobile c. Sur l'auto-assemblage

Si le fait que les cellules sont encombrées est démontré depuis un certain temps (par exemple les articles de Zimmerman[132] et Fulton[41], explicitant le volume occupé par les macromolécules dans le cytoplasme, datent de la fin du 20ème siècle), les études de l'impact de l'encom-

brement dans les cellules furent longtemps négligées [37, 38] car complexes à réaliser. En effet, l'influence de l'encombrement macromoléculaire sur les réactions biochimiques a d'abord été beaucoup étudiée *in vitro* dans des solutions artificielles [77][37], dans lesquelles des encombrants inertes ont été ajoutés aux solutions. Il a été montré que ces particules augmentent le volume d'exclusion (et donc l'encombrement) et changent le taux de réaction [23]. Les molécules inertes couramment utilisés sont le PEG (polyethylene glycol) [115], le dextran [101] et la BSA (bovine serum albumin) [97], mais d'autres molécules peuvent être utilisées.

Plus particulièrement, ces études montrent des impacts de l'encombrement sur différents phénomènes tels que le fonctionnement enzymatique [23], la stabilité des protéines [8][119] ou la fabrication de fibre [118, 123] pour ne citer que ceci, avec de nombreuses revues répertoriant l'ensemble de ces impacts (comme le tableau 1.1, adapté de la review de "Chebotareva, 2004") [23] détaillant les différentes méthodes pour encombrer artificiellement une solution et certains effets émergeant de l'ajout de ces particules.

Observation	Encombrant	Reférence
Effets sur la stabilité de macromolécules		
Conformation de la ribonuclease A	PEG 20,000 (up to 35%) Ficoll 70 (up to 35%)	[115]
Stabilisation de la Lysozyme	dextran (up to 300 g/liter)	[101]
Stabilisation de la thrombin	ribonuclease (31-124 g/liter)	[80]
Impact sur les taux d'association et d'auto-assemblage		
Auto-assemblage du fibrinogène	BSA	[97]
Auto-assemblage de la tubuline	dextran	[79]
Auto-assemblage du pyruvate dehydrogenase	PEG	[14]
Effet sur des taux de réactions		
Accélération de la polymérisation d'actine	PEG 6000 (80 g/liter)	[113]
Formation de fibre amyloid	dextran (150 g/liter)	[52]
Diminution du taux de denaturation d'une enzyme de la glycolyse	PEG 20,000 (225 g/liter)	[95]

TABLE 1.1 – Tableau issu de l'article de "Chebotareva, 2004" répertoriant de nombreuse réactions impactées par des encombrants rajoutés dans des solutions.[23]

L'origine de ces phénomènes a été étudiée théoriquement par plusieurs groupes afin d'expliciter l'impact du volume exclu sur les réactions. Par exemple le groupe de Minton [77, 76] a développé un modèle en se basant sur les premières expériences dans le domaine. Dans cette étude, il a été montré que l'augmentation de l'encombrement favorise la conformation des macromolécules sous forme de sphère, ainsi que l'agrégation entre macromolécules similaires, et enclenche une diminution des réactions lorsque l'encombrement augmente. Ils ont aussi relevé que ces effets dépendent de la taille de l'encombrant, et que l'impact de l'encombrement de grandes molécules sur de plus petites est moins important que l'impact de l'encombrement de petites particules sur les plus grandes. Cependant, cela reste des études dans des solutions modèles réalisées *in-silico* ou *in-vitro* à l'aide d'encombrant synthétiques. Il fut donc nécessaire de développer des techniques qui permettent d'observer l'encombrement et son impact directement dans les cellules, afin de vérifier ces résultats théoriques et numériques.

Certaines méthodes existent pour suivre la stabilité de protéines en spectrométrie [44, 55] et permettent de retrouver des effets similaires entre les études *in-vitro* et *in-vivo* sur le renforcement de la stabilité en présence d'encombrant. Cependant, la méthode la plus pratique reste encore l'observation en microscopie. Une des techniques qui a permit la quantification de l'encombrement dans les cellules est la microscopie par cryoelectro tomographie [71]. Cette méthode a permit d'avoir des images extrêmement précises de l'intérieur des cellules (Fig.1.3). Cependant, même si ces images permettent d'avoir une idée de l'encombrement dans l'espace et de vérifier les valeurs de l'encombrement précédemment découvertes, elles ne permettent pas d'avoir des informations sur la dynamique des réactions dans les cellules. En particulier, la diffusion des espèces dans les cellules est une information importante à déterminer, car centrale dans les calculs. Pour obtenir cette information, il existe de nombreuses méthodes que nous pouvons distinguer en deux grandes familles.

1.2.1 Mesure de l'encombrement dans les cellules

La première consiste à suivre directement des macromolécules ou des organelles dans les cellules à l'aide de marquages fluorescents. Par exemple, l'étude dont est tirée la figure (1.7) "Bakshi et al"[6], montre une méthode permettant de suivre le mouvement de ribosomes dans le cytoplasme de la bactérie *E. coli*. Dans un autre exemple toujours dans *E. coli*, nous observons le suivi dynamique d'ARNm dans l'article de "Golding et Cox"[45] qui étudie les temps de passage de ceux-ci dans les différentes parties de la cellule.

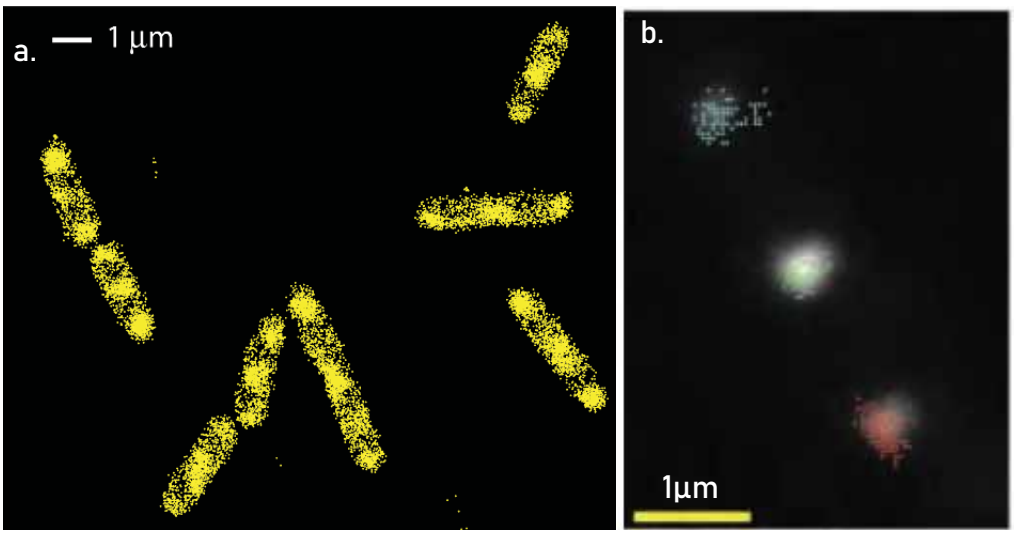


FIGURE 1.7 – a. Illustration de la détection des ribosomes dans *E. coli* (image tirée de "Bakshi et al"[6]). b. Illustration de la détection de particule d'ARNm dans *E. coli* (image tirée de "Golding et Cox"[45]).

Une autre méthode consiste à placer des sondes artificielles dans le cytoplasme des cellules [124, 27]. Cependant, cette méthode amène un certain nombre de problématiques, car, non seulement ces techniques ne sont pas évidentes à réaliser expérimentalement, mais en plus l'injection va perturber les cellules en diluant le cytoplasme.

Pour cette raison, des équipes de recherches ont développé des techniques permettant l'encodage génétique de protéines capables de s'agréger pour former des traceurs brillants. Ces traceurs peuvent être suivis dans les cellules, pour mesurer l'encombrement à partir de leur mouvement. Nous pouvons par exemple citer les protéines μ-NS ou encore des particules d'ARNm, mais leur taille est souvent mal définie. Dans le cadre d'une étude sur la régulation de l'encombrement [30], un nouveau système de nanoparticules a été développé dans le groupe de L. Holt : les GEMs. La particularité des GEMs est qu'elles sont produites directement par les cellules et sont formées par auto-assemblage. Ces GEMs sont composées d'un squelette de protéines pouvant multimériser, s'auto-assemblant pour former des sphères de tailles spécifiques (20nm ou 40 nm), décorées par des protéines fluorescentes (GFP) afin de suivre ces particules sous un microscope.

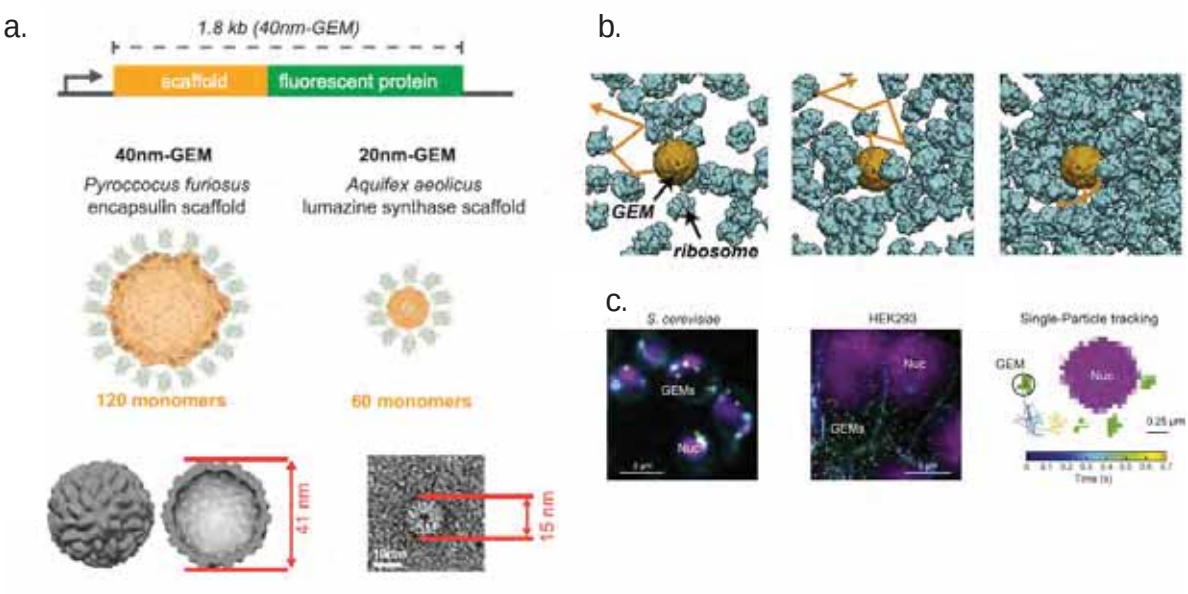


FIGURE 1.8 – Illustration de la structure et de l'apparence des GEMs issue de l'article "Delarue et al.,2018" [30]

Une des informations qu'ont apportés les études numériques de l'impact de l'encombrement est que celui-ci dépend de la taille des objets observés. Les méthodes de suivi de particules sont limitées lorsque celles-ci sont trop petites : leur mouvement est alors trop rapide. C'est pourquoi d'autres méthodes d'observation ont été développées pour suivre le mouvement de protéines marquées en fluorescence, plus petites.

Une seconde famille de méthodes, non basées sur le suivi de particules uniques mais plutôt sur des techniques de FRAP, FCS et FRET, consiste à illuminer les cellules avec un laser et observer différents paramètres reliant fluorescence à un mouvement de particules. Pour le FRAP, après l'illumination forte et localisée en un point de la cellule, c'est la récupération de la zone photoblanchie par la diffusion de protéines fluorescentes qui est observée. Pour la FCS, l'idée est d'observer la variation de l'intensité de fluorescence pour déterminer la diffusion de particules passant devant un faisceau laser. Pour terminer, le FRET utilise un duo de protéines et le transfert d'énergie entre celles-ci. L'une va être activée par le laser et produire un rayonnement qui va activer la seconde. Cette méthode permet non seulement de suivre la diffusion des protéines, mais également d'étudier la distance entre deux protéines. En effet, plus les deux protéines marquées pour le FRET sont proches, plus le transfert de fluorescence sera important et la fluorescence de la deuxième sonde sera importante. Cette propriété a été exploitée pour créer un senseur de l'encombrement dans l'étude de Boersma et al[11]. Ils ont vérifié leur senseur en soumettant des cellules à des chocs osmotiques, augmentant leur encombrement, et ont remarqué que le rapport de fluorescence est plus important dans les cellules avec un encombrement plus fort Fig.(1.9)

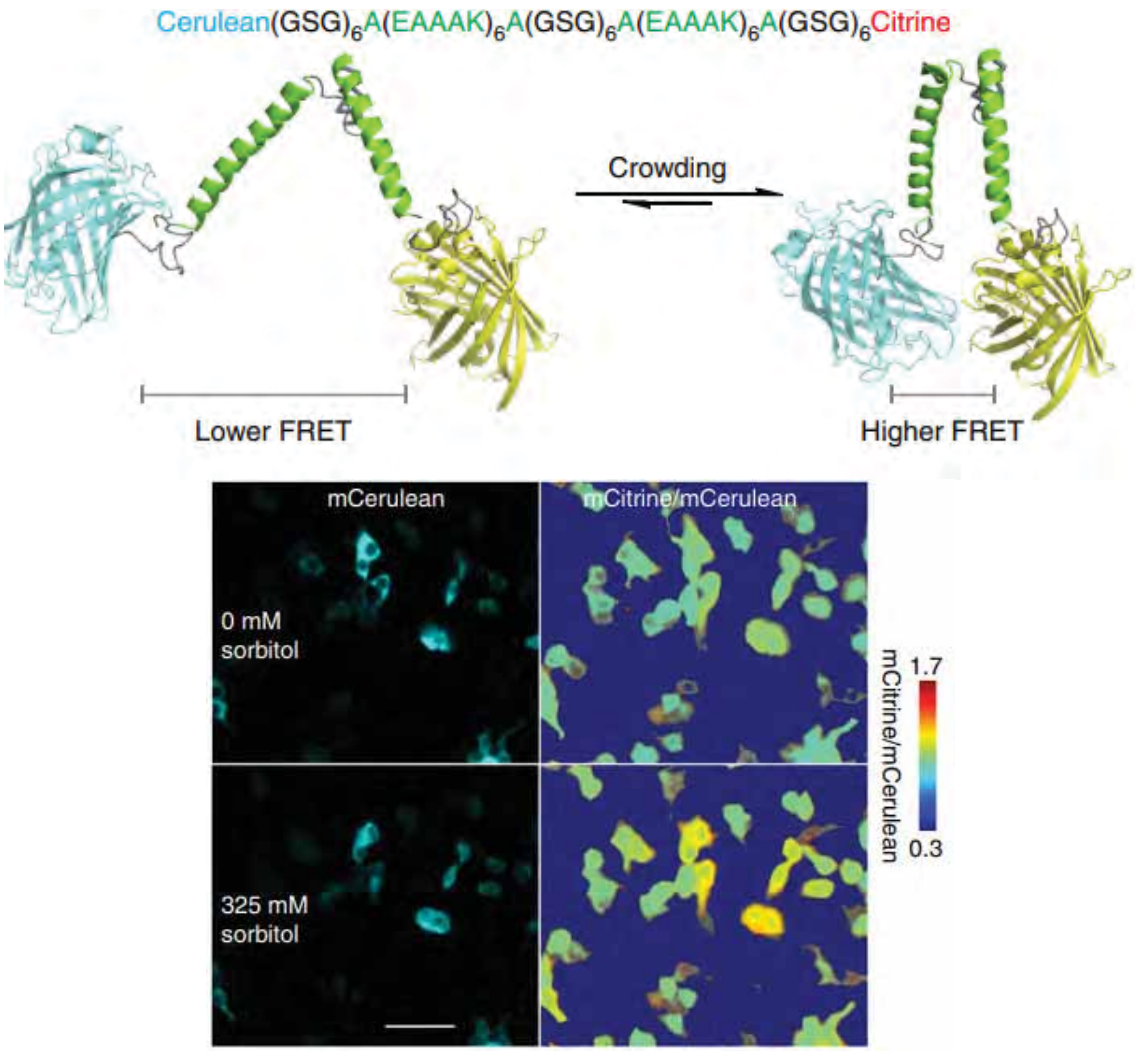


FIGURE 1.9 – a.Illustration du fonctionnement de la sonde FRET utilisée dans "Boersma et al"[11] b. Résultat dans des cellules HEK293 soumises à un stress osmotique

1.2.2 Effet de l'encombrement dans les cellules

Toutes ces études sur l'encombrement ont montré différents effets sur des réactions dans les cellules, sur la structure des protéines [62], la modulation de la transcription de l'ADN ([69]), des déplacements de protéines réduits ([112]), des liaisons plus faibles entre protéines ([92]), ou plus généralement de l'impact sur la physiologie de la cellule(diminution des réactions biochimiques, changement de la viscosité du cytoplasme) [82].

Un impact particulièrement marquant de l'encombrement a été montré dans l'étude Miermont et al [74]. Dans cet article, un lien entre la diminution du taux de réactions dans les cellules et les chocs osmotiques a pu être mis en lumière, avec une démonstration que dans le cas où l'encombrement des cellules augmente fortement, le cytoplasme de celles-ci va être quasiment gelé et les réactions à l'intérieur vont être extrêmement ralenties.

En conclusion, les cellules sont donc des systèmes naturellement encombrés. Une question qui apparait naturellement est donc de savoir comment cet encombrement peut être modulé dans les cellules. Il a été récemment montré que lorsque l'augmentation du volume d'une cellule est limité (par l'environnement par exemple), sa production de biomasse augmente et se découple de la croissance augmentant ainsi son encombrement Fig.(1.10)[61]. Ceci semble lier l'encombrement au confinement des cellules.

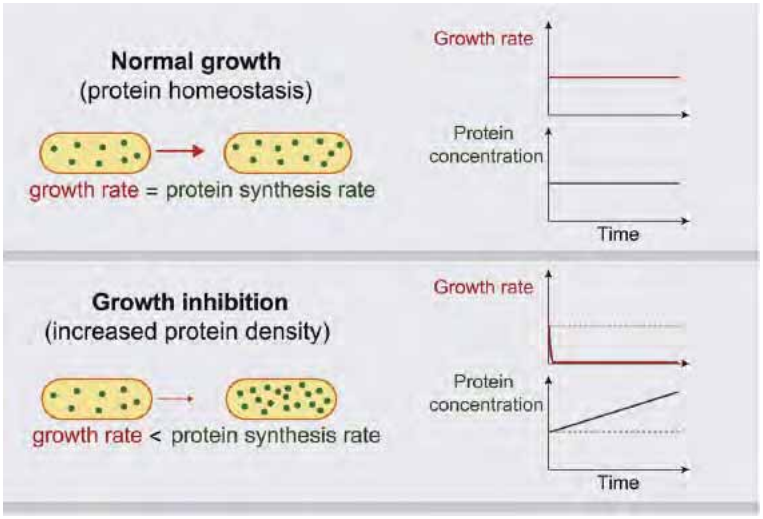


FIGURE 1.10 – Illustration du lien entre la croissance et l'encombrement tiré dans "Knapp et al., 2019"

1.3 Les cellules proliférant sous confinement déforment leur environnement

La première chose remarquable sur la croissance sous confinement est que les cellules vont développer une force pour déformer leur environnement, qui doit être nécessaire pour continuer de proliférer. Il est notable que ce phénomène se retrouve chez différents organismes. Si, pour les plantes, il n'est pas nécessaire d'illustrer ce phénomène tant il est commun, il est important de noter que son étude est particulièrement importante dans le cadre de l'étude des sols [9].

Un exemple évident pour les cellules mammifères est celui des tumeurs. En effet, certaines d'entre elles poussent dans des environnements très denses (organes, os, etc.). Cette croissance localisée va entrainer la génération de forces, et des tumeurs très compressées. Ceci a été montré dans l'article de "Stylianopoulos, et al. " [110] où des tumeurs ont été coupées le long de l'axe équatorial, et où les auteurs ont mesuré et modélisé leur relaxation de cette dernière, signant l'accumulation de contraintes durant la croissance confinée. Ceci est indicatif de la présence d'une force de compression sur, et par les cellules (Fig.1.11.a). Expérimentalement, étudier le confinement n'est pas chose aisée. Une méthode couramment utilisée pour imposer celui-ci est l'utilisation de capsules d'hydrogel dans lesquelles des cellules sont enfermées [2]. Les chercheurs ont pu constater que les capsules, une fois remplies, sont déformées par les cellules à cause des forces générées au cours de leur croissance (Fig.1.11.b).

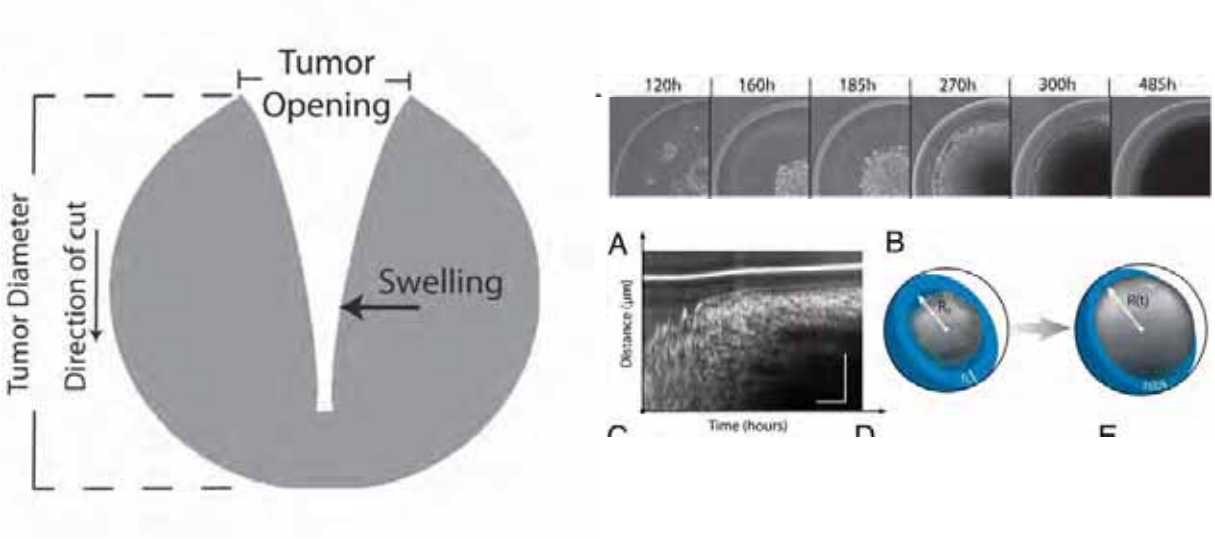


FIGURE 1.11 – Principe de l'expérience de l'article "Stylianopoulos et al."[110] où une tumeur est coupée sur son plan équatorial. La relaxation de la tumeur permet une mesure *in-vivo* de la contrainte mécanique stockée. b. Résultat de l'expérience de "Alessandri et al"[2] dans laquelle des cellules sont placées dans des capsules d'alginate. Les cellules vont déformer ces capsules après les avoir remplies, générant des contraintes mécaniques.

Pour les bactéries, il a été constaté, comme pour les tumeurs, que lorsque des biofilms se déchirent il y a un relâchement des cellules autour de cette déchirure, ce qui semble indiquer la génération de forces par les cellules [116, 4](Fig.1.12.b). De plus, l'étude de "Stewart et Robertson" [109] a montré que lorsque des cellules *E. coli* étaient placées dans un bioréacteur fermé, elles étaient capables de développer des contraintes de plusieurs centaines de kilo pascals ce qui est équivalent à la pression hydrostatique dans un pneu de voiture (Fig.1.12.a).

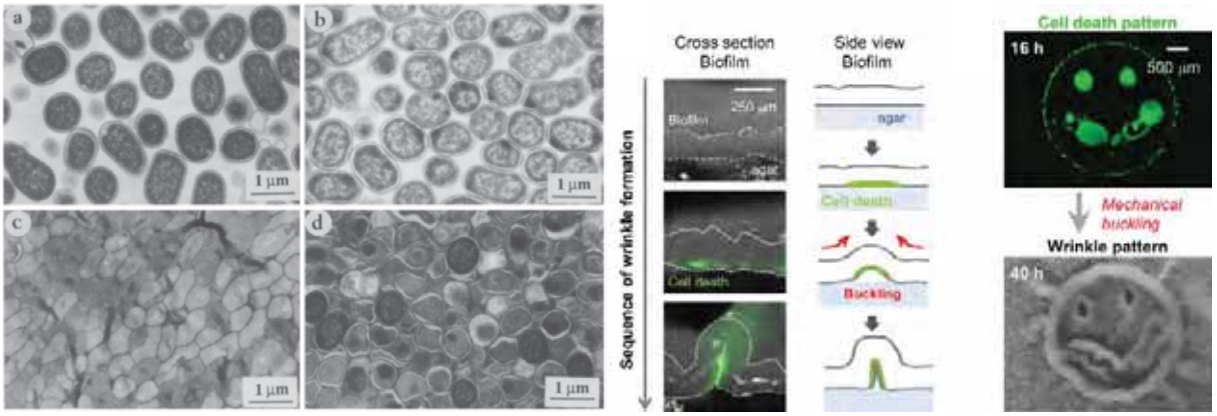


FIGURE 1.12 – a. Images des bactéries soumisses à une compression de plus en plus forte dans des bioréacteurs [109]. b. Illustration de l'effet de flambage dans des biofilms de bactéries[116, 4].

Pour les levures, il a pu être constaté précédemment que certaines levures pathogènes peuvent envahir leurs hôtes (*C. albicans*) grâce au développement d'une pression importante au niveau de l'extrémité bout de la cellule[47]. Cette pression a été quantifiée sur la levure *S. cerevisiae* dans des chambres microfluidiques avec des forces allant presque jusq'au MPascal [31](équivalent à la pression dans une bouteille de champagne). Ces forces sont issues du confinement des cellules. La review de "Rivera et al" met aussi en lumière le fait que l'organisation des populations des cellules

face à ces contraintes dépend énormément des cellules étudiées [98].

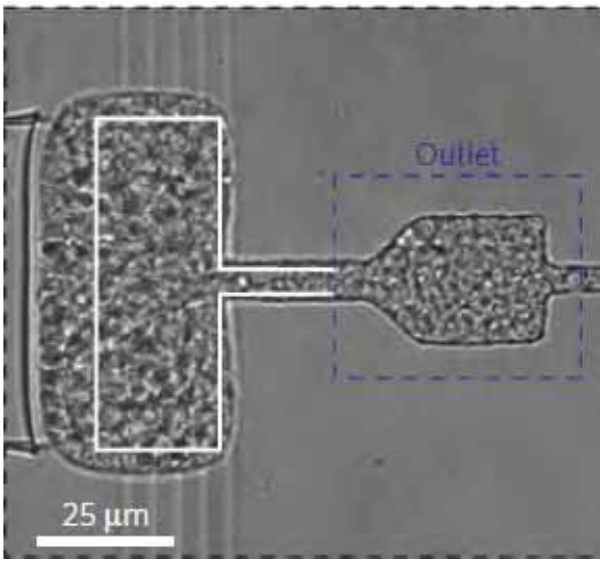


FIGURE 1.13 – Levures déformant une chambre microfluidique (image tirée de "Delarue et al, 2016[31])

Les forces générées par les cellules pour déformer l'environnement vont non seulement être appliquées sur le matériel les confinant (goudron, organes, etc.) mais également sur les autres cellules, amenant ainsi à des forces compressives qui vont impacter le fonctionnement des cellules. Cette pression est donc dite **induite par la croissance** et va mener à des contraintes compressives des cellules.

1.4 Impact des contraintes compressives sur les cellules

Il existe plusieurs méthodes pour exercer des contraintes mécaniques, comme les chocs osmotiques. Dans le cas des plantes par exemple, il a été montré que lorsque l'on augmentait la concentration en sel dans le milieu de culture, celles-ci se développaient moins vite [86]. Ce résultat avait déjà été montré aussi sur les levures [85] même si celles ci sont capables de s'adapter au chocs osmotiques. L'impact des contraintes mécaniques sur la croissance est un sujet particulièrement actif au sein de la recherche contre le cancer. Actif et ancien puisque l'on retrouve des traces de traitement du cancer à l'aide de compression à travers l'histoire [50]. Il a été montré dans de nombreux articles que cette compression (qui peut être réalisée de nombreuses façons différentes) entraine une croissance plus lente des cellules cancéreuses, notamment les exemples cités précédemment de cellules poussant dans des billes d'alginate [2], ou encore dans des gels d'agarose [53, 99].

Cette diminution de la croissance a aussi été démontrée dans les bactéries [25, 109], dans les plantes [39, 15] et dans les levures [31, 32]. Cependant la diminution de la croissance n'est pas la seule conséquence connue de ces forces compressives. En effet certaines études montrent que la pression induite par la croissance peut être la cause d'apparition ou de développement de tumeurs [40] et de pathologies microbiennes comme l'infection au méningoccooque [13]. En plus d'être à l'origine de problèmes de santé, ces contraintes compressives entrainent une résistance aux traitements anti-cancer [99] [94] ou aux antibiotiques [129].

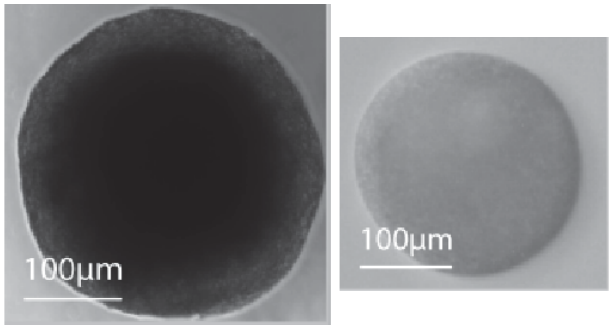


FIGURE 1.14 – a. Sphéroïde de cellules mammifères libre, dans un gel d'agar mou et dans un gel d'agar dur (de gauche à droite) avec en vert les cellules en apoptose (image issue de l'article "Cheng et al, 2009" [24]. b. Sphéroïde de cellules mammifères confiné ou non (image issue de l'article "Rizzuti et al, 2020" [99])

.

Dans l'exemple montré dans la figure 1.15 issue de l'article "Rizzuti et al, 2020", un sphéroïde de cellules mammifère est mis en contact avec une drogue anticancéreuse (la gemcitabine), qui induit l'apoptose des cellules lorsque le sphéroïde est libre de pousser et que les cellules prolifèrent. Cependant, si ce sphéroïde croît dans un gel d'agar qui le confine, l'effet de la drogue est beaucoup moins fort. L'explication de ce phénomène vient du fait que les drogues anticancéreuses ciblent les cellules en prolifération, or lorsque les cellules sont sous confinement elles prolifèrent beaucoup moins et sont donc moins sensibles aux drogues.

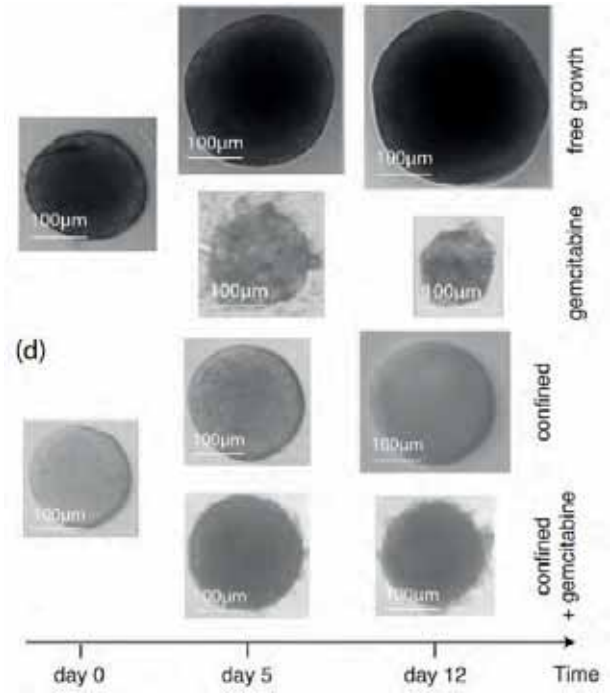


FIGURE 1.15 – Sphéroïde de cellules mammifères libres, sur lesquelles une drogue est appliquée (image issue de l'article "Rizzuti et al, 2020" [99])

.

Nous venons donc de voir que :

1. Tous les organismes pouvaient croitre sous confinement
2. Cette croissance confinée implique l'émergence d'une pression induite par la croissance,
3. La prolifération cellulaire semble dramatiquement limitée par ce confinement et ces forces

Si l'étude de l'impact de la prolifération des cellules cancéreuses sous pression est une question particulièrement intéressante et surtout importante à répondre, tous les organismes sont concernés et méritent de l'attention. Ceci dit, tous les organismes ne sont pas facilement étudiables, comme par exemple les cellules cancéreuses, assez fragiles lors de leur cultures, ou les cellules bactériennes, assez petites. C'est pourquoi il peut être nécessaire d'utiliser d'autre cellules comme modèle, comme par exemple la levure *S. cerevisiae*. Cette levure possède toutes les qualités nécessaires à l'expérimentation (taux de croissance rapide, facilité d'utilisation, génération d'une pression importante, facilement modifiable génétiquement). De plus cette levure représente un bon modèle pour l'étude de la prolifération des cancers, même si cela est controversé [51, 70, 65].

1.5 Comment les cellules détectent les contraintes compressives

Nous venons de voir que les cellules sont impactées par les contraintes compressives. Une question qui ressort de cette observation est de savoir comment les cellules détectent ces contraintes compressives. Les précédentes pistes sont pour la plupart basées sur les variations de la tension de membrane des cellules [57, 117]. Mais la présence de voies spécifiques détectant ces contraintes reste sous-documentée. Cependant, depuis quelques années, certaines études démontrent l'existence de voies de signalisations spécifiques, comme la voie SMuSh et le réseau SCWISh chez *S. cerevisiae*, qui ont été montrés comme indispensables pour la survie sous compression [32]. Récemment, une étude sur *S. pombe* [84] a démontré comment la protéine Wsc1 était utilisée comme détecteur de stress mécanique par la paroi des cellules et permet, lorsque qu'elle est activée par une contrainte mécanique, de déclencher des voies de signalisation de survie sous pression. Une étude de " Mishra et al"[81] prouve aussi un lien avec la protéine Mid2 et des protéines impliquées dans des canaux ioniques de calcium (Mid1 et Cch1). L'activation de la cascade des protéines impliquées dans les voies décrites dans cette étude entraine un ralentissement de la croissance permettant à celle-ci de ne pas rentrer dans des parties du cycle cellulaire ou elle serait susceptible de ne pas supporter les contraintes compressives.

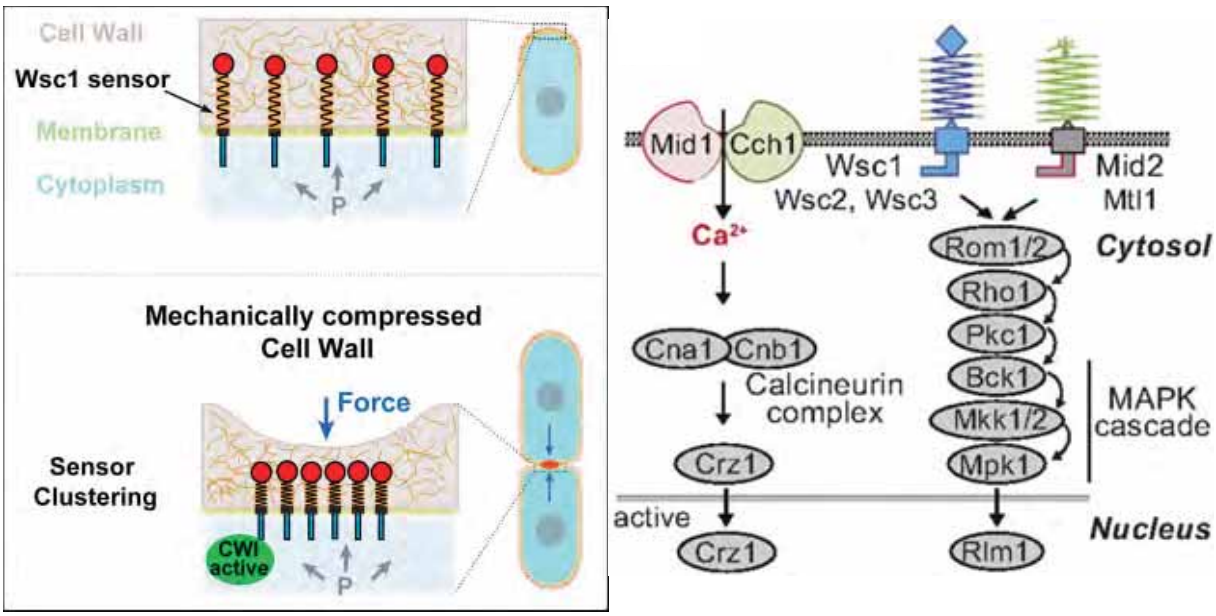


FIGURE 1.16 – a. Illustration de la détection des contraintes compressives issue de l'article "Neeli et al"[84]. b. Illustration de la détection des contraintes compressives issue de l'article " Mishra et al"[81] [99])

.

A part ces études, à notre connaissance, rien d'autre n'est connu sur la mécano-sensibilité des

contraintes compressives chez les levures. De plus, ceci semble être encore plus limité chez les cellules mammifères et les bactéries, pour lesquelles aucun senseur n'a été identifié. Outre les voies de signalisation, existerait-il d'autres moyens pour les cellules de détecter et de répondre aux contraintes ?

Une piste d'étude intéressante pourrait être l'encombrement interne des cellules. En effet, si la composition des cellules fait que celles-ci sont naturellement encombrés, lorsque les cellules subissent des contraintes compressives cet encombrement semble varier.

De plus, nous venons de voir que lorsque les cellules sont placées sous confinement elles vont développer une pression induite par la croissance en poussant les unes sur les autres, ce qui va induire des contraintes compressives. Il a été montré que ces contraintes compressives impactent de nombreux phénomènes dans les cellules et particulièrement la croissance.

L'étude décrite dans ce manuscrit aura pour objectif de répondre aux questions suivantes : comment décrire l'encombrement dans les cellules ? Quel est l'origine de la pression induite par la croissance, et quel est son lien avec l'encombrement ? Comment expliquer que certains impacts des contraintes compressives ont pour origine une modulation direct de l'encombrement ?

1.6 Résumé

Nous allons débuter ce manuscrit par un chapitre dans lequel nous reviendrons en détail sur le principe physique de la diffusion dans les cellules. Nous commencerons par décrire la diffusion brownienne en général, sa définition, son observation, ses métriques, puis nous comparerons celle-ci à la diffusion dans la cellule. La compréhension des différences entre le mouvement brownien libre et le déplacement de particules dans les cellules se fera au travers d'une simulation de colloïdes de sphères dures.

Dans le chapitre suivant, nous étudierons l'impact des contraintes physiques sur cette diffusion intracellulaire. Nous expliquerons dans un premier temps comment nous mesurons la pression induite par la croissance, puis nous définirons la pression de turgescence, avant d'observer l'impact des contraintes mécaniques sur la diffusion.

Nous montrerons comment l'équilibre des pressions dans les cellules est responsable des changements de la diffusion dans celles-ci.

Nous continuerons dans le troisième chapitre notre étude sur l'impact des contraintes mécaniques, en nous intéressant à la croissance cellulaire. Nous démarrerons par une observation de la croissance lorsque les cellules sont confinées, et étudierons si cet impact est lié à des voies de signalisation particulières. Nous chercherons ensuite à comprendre d'où viennent les modifications du taux de croissance, en nous focalisant sur l'étude de la production des protéines. Le dernier chapitre de cette étude sera quant à lui centré sur l'étude de mécanismes biologiques régulés par la cellule, tels que le métabolisme qui est la source d'énergie indispensable à l'ensemble des mécanismes biologiques, ou la séparation de phase qui permet l'existence de sous-compartiment sans membranes dans les cellules.

Nous conclurons ce manuscrit par une présentation des perspectives de ce travail sur l'universalité de ce phénomène biophysique dans d'autre organismes. Plusieurs précisions sur les méthodes sont à relever, premièrement : l'ensemble des méthodes expérimentales utilisées lors de cette étude sera décrit dans le dernier chapitre de ce manuscrit. Deuxièmement dans le cadre de cette étude nous allons évoquer des modèles mathématiques qui ont été créés pour la publication de l'article en annexe 1, mais qui n'ont pas été directement développés par moi-même. Les méthodes de calculs de ces modèles seront explicitées dans les suppléments de cet article, placés également en annexe.

Chapitre 2

Déplacement dans la cellule : un mouvement limité par les encombrants

Dans l'introduction, nous avons vu que les cellules sont des systèmes complexes et encombrés par leurs composants. Or, cet encombrement va entraîner des perturbations dans la diffusion de ces composants. Ainsi, ce phénomène de diffusion, longtemps négligé dans l'étude des réactions prenant place à l'intérieur des cellules([36] [38]), peut avoir des implications importantes sur la physiologie des cellules[74, 31, 83].

Afin de comprendre comment l'encombrement impacte le déplacement de macromolécules dans les cellules, nous allons, dans une première partie, décrire un mouvement brownien de particules et ses caractéristiques. Dans un second temps, nous allons voir que nos résultats expérimentaux sont incompatibles avec cette théorie brownienne. Ce qui nous amènera, finalement, à étudier le mouvement de particules mélangées avec des encombrants au travers d'une simulation de colloïdes de sphères dures que nous avons développée.

2.1 Origine et description du mouvement brownien

Dans cette première partie, nous allons présenter le modèle théorique du mouvement brownien avec une présentation historique des équations fondamentales de ce modèle. Cette présentation sera suivie par une sélection de paramètres mesurables qui nous permettront de comparer la théorie, les expériences et les simulations.

2.1.1 Historique et équations fondamentales

Lorsque des particules sont placées dans un milieu liquide ou gazeux, elles se déplacent selon un mouvement décrit comme "brownien", terme venant de Robert Brown qui a le premier décrit ce type de déplacement au XIXème siècle après avoir observé l'intérieur de grains de pollen au microscope [17].

La particularité principale de ce mouvement est qu'il est aléatoire et que le déplacement moyen est nul : la somme de l'ensemble des vecteurs de déplacement est zéro. Les particules possédant un mouvement brownien semblent donc se déplacer autour d'un point central. Cependant, en étudiant ce mouvement et le concept de diffusion appliqué à la finance, Louis Bachelier [5] a démontré que l'on peut décrire celui-ci non pas par son déplacement mais par la moyenne quadratique de son déplacement, noté MSD (*Mean Square Displacement*) dans la suite, selon l'équation suivante :

$$MSD(t) = \left\langle X^2(t) \right\rangle = 2dDt \tag{2.1}$$

Avec d la dimension du mouvement, D le coefficient de diffusion et t le temps écoulé.

Quelques années plus tard, Albert Einstein [35] va relier le coefficient de diffusion au propriétés physiques du milieu dans lequel sont placées les particules, donnant lieu à l'équation de Stokes-Einstein suivante :

$$D = \frac{k_b T}{6\pi r \mu} \tag{2.2}$$

Avec k_b la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin, r le rayon de la particule étudiée et μ la viscosité dynamique du milieu.

2.1.2 Description du déplacement de particule

Dans ce manuscrit, nous allons suivre le déplacement des particules nanométriques présentées dans l'introduction : les GEMs [30]. Plus précisément nous allons utiliser des GEMs de diamètre 40nm induites dans le cytoplasme de *S. cerevisae* Wild-Type. Pour étudier leurs déplace-

ments, nous allons les observer en microscopie confocale (Fig.2.1.a), acquérir des films et analyser leurs déplacements (single-particle tracking, ou SPT). Cela est réalisé grâce à des programmes d'analyse développés spécialement pour ce type d'étude, tels que le plugin Mosaic [102] utilisé afin de détecter les GEMs et d'extraire leur trajectoire. Ceci nous permet d'obtenir des milliers de trajectoires pour chaque acquisition (Fig.2.1.b).

La valeur de la MSD pour un temps d'observation τ donné peut être obtenue à partir de ces déplacements. Elle est la somme des déplacements quadratiques se déroulant sur ce temps τ divisée par le nombre de déplacements (moyenne quadratique). Pour illustrer cette définition, prenons le cas du schéma de la Fig.2.1.b. Pendant le temps d'observation τ (ligne bleue) la MSD correspond à la somme des longueurs au carré des segments bleus divisée par le nombre de ces segments (15 ici). Dans le cas d'un temps d'observation plus grand (courbe rouge) la MSD sera la somme des longueurs au carré des segments rouges rapportée aux 6 segments. Ainsi, avec un temps d'observation plus long, l'objet diverge plus loin de sa position initiale. Nous remarquons également que la statistique diminue avec une augmentation de τ.

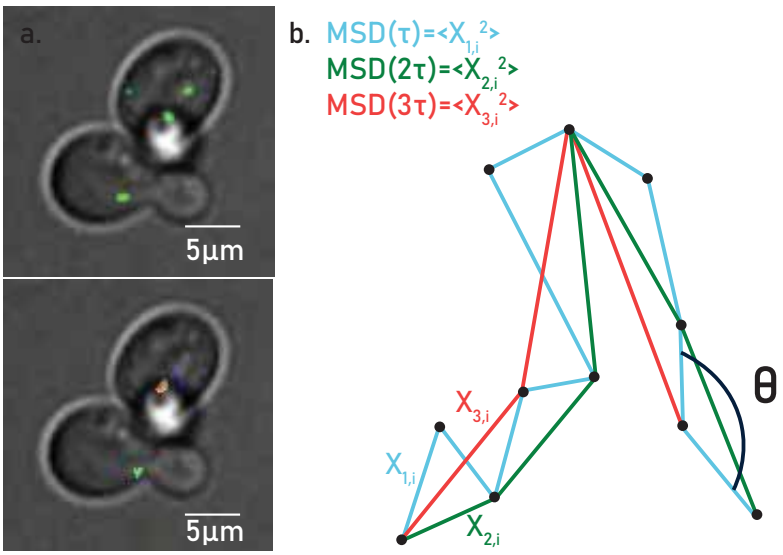


FIGURE 2.1 – a. Particules GEMs de 40 nm de diamètre dans des cellules S. cerevisae Wild-Type b. Trajectoire d'une particule (point noir) avec une illustration des MSD pour différents temps d'observation (τ en bleu, 2τ en vert, et 3τ en rouge) avec une illustration d'un angle θ fait par la particule

Nous allons directement extraire différentes informations sur chaque trajectoire :

— La MSD en fonction des différents intervalles de temps, nous permettant de remonter au coefficient de diffusion.
— La distribution de déplacements.
— La distribution des angles.

Ces résultats seront ensuite moyennés sur l'ensemble des trajectoires acquises, et comparés à différents modèles. Nous allons commencer par illustrer ces mesurables à l'aide d'une simulation de dynamique brownienne.

2.1.3 Les mesurables

Simulation brownienne

Pour illustrer ces mesures réalisées à partir de SPT des nanoparticules dans les cellules, nous avons réalisé une simulation d'un marcheur aléatoire possédant une dynamique brownienne. Nous allons considérer des particules de 40nm dans de l'eau afin de correspondre, a priori, aux expériences. Les particules vont donc se déplacer avec un coefficient de diffusion déduit de l'équation de Stokes-Einstein (Eq.2.2), $D = 11\mu m^2.s^{-1}$. Nous allons simuler, à l'aide d'un script réalisé sous Matlab, un déplacement de deux secondes d'une particule avec un pas de temps de $\Delta t = 1$ ms. Pendant chaque pas de temps la particule va se déplacer vers de nouvelles coordonnées tirées aléatoirement dans une distribution gaussienne centrée en zéro et d'une largeur égale au coefficient de diffusion. Afin d'avoir des statistiques satisfaisantes (ce point sera détaillé par la suite), nous simulons 1000 particules indépendantes et analysons leurs trajectoires (Fig.2.2a). Cette simulation n'est pas spécifique à cette étude et a été réalisée de nombreuse fois dans la littérature. Cependant elle va nous permettre d'illustrer les différents mesurables que nous allons utiliser afin de décrire de plusieurs façons le déplacement de particules.

Trajectoire et distribution des déplacements

L'analyse de la trajectoire réalisée par une des particules simulées permet d'illustrer la différence entre les termes : intervalle de temps d'observation τ et pas de temps de la simulation Δ t.

La simulation est faite avec un pas de temps Δ t de 1 ms (trajectoire rouge sur la Fig.2.2.a). Mais il est possible de comparer les différentes mesurables évoquées précédemment en fonction de l'intervalle de temps d'observation τ (Par exemple pour τ = 10 ms points bleu sur la trajectoire Fig2.2.a)

Nous constatons que cela amène des différences importantes sur les résultats de la distribution des déplacements (Fig.2.2.b). En effet, pour la distribution calculée avec τ = 10 ms, les distances parcourues sont plus grandes. Cela vient du fait que les trajectoires sont déterminées à partir de points plus éloignés temporellement, et donc que la particule peut parcourir plus de chemin entre deux points d'observation.

Dans le cas d'une dynamique brownienne, le déplacement dans chaque direction (x,y) est aléatoire et suit, pour un grand nombre de pas, une distribution gaussienne. Qui peut s'écrire $P(x) = 1/\sigma\sqrt{(2\pi)}\exp(-x^2/2\sigma^2)$, où $\sigma^2 = 2D\tau$ est le second moment de la distribution, défini comme étant la MSD dans une direction. Pour un déplacement $r = \sqrt{(x^2 + y^2)}$ avec x et y suivant une distribution gaussienne, la probabilité de déplacement devient une fonction de Rayleigh s'écrivant $P(r) = r/\sigma^2\exp(-r^2/2\sigma^2)$. Nous observons que cette fonction prédit parfaitement nos simulations (Fig2.2.b).

MSD et coefficient de diffusion

Nous regardons ensuite la MSD (Eq.2.1) en fonction de l'intervalle de temps τ, ainsi que le coefficient de diffusion qui en découle.

Comme décrit dans l'équation de Bachelier (Eq.2.1) nous observons une MSD linéaire en fonction du temps (Fig.2.3a) Cependant, il faut tenir compte du facteur statistique. En effet, sa précision dépend du nombre de déplacements fait pour chaque intervalle de temps. Nous pouvons voir que pour les temps longs du graphe Fig.2.3.a, l'erreur augmente fortement avec le temps. Ceci s'explique par le fait que lorsque le temps d'observation τ augmente, le nombre de trajectoires analysées diminue. Par exemple, pour une trajectoire de 10 pas de temps, nous pouvons observer 10 segments de 1 pas de temps, 5 de deux pas et ainsi jusqu'à avoir un seul segment analysable pour temps d'observation de 10 pas de temps.

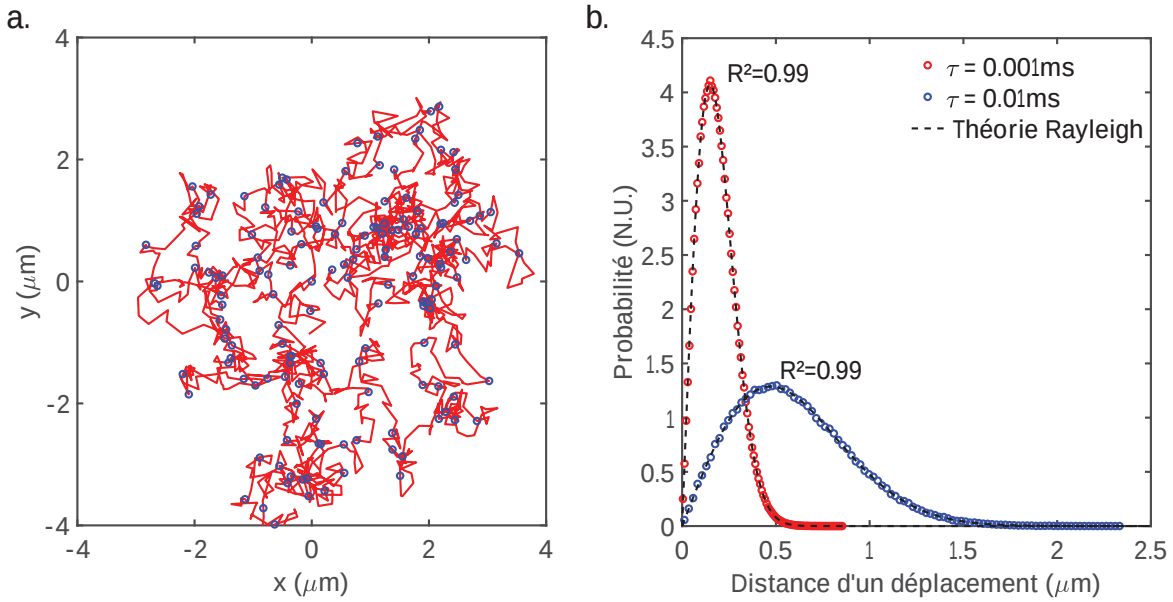


FIGURE 2.2 – a. Exemple de trajectoire simulée de particules de 40nm dans l'eau pendant un temps de deux secondes. b. Distribution des déplacements pour un intervalle de temps de 200ms pour les 1000 particules simulées

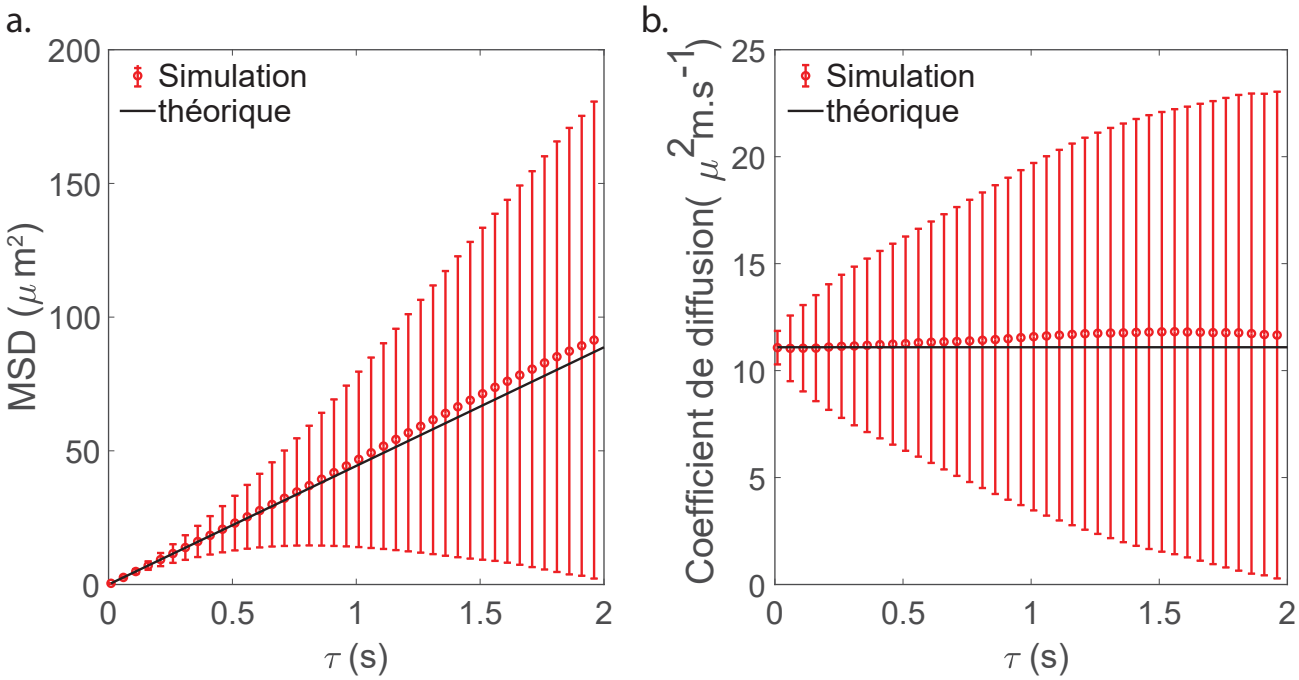


FIGURE 2.3 – a. MSD moyenne pour les 1000 particules simulées (en rouge) et MSD théorique d'après l'équation de Bachelier (en noire) en fonction de l'intervalle de temps τ b. Coefficient de diffusion moyen pour les 1000 particules simulées (en rouge) et théorique d'après l'équation d'Einstein (en noire) en fonction de l'intervalle de temps.

Dans notre exemple, il est donc nécessaire d'avoir un nombre important de particules afin d'obtenir un résultat avec une statistique convaincante. Dans la suite, nous comparerons donc le plus souvent les différentes conditions pour le temps où nous disposerons d'une bonne statistique.

L'observable suivante est le coefficient de diffusion extrait de la MSD d'après l'équation 2.1 : $D(\tau) = MSD/4\tau$. Le graphe de ce coefficient en fonction de l'intervalle de temps (Fig.2.3b) nous

montre, de nouveau, que le choix du temps de mesure sera important et que celui-ci doit être fait dans le point possédant le plus de statistique possible. Tracer $D(\tau) = MSD/4\tau$ nous permet d'identifier une potentielle dépendance en τ du coefficient de diffusion. Dans le cas d'une dynamique brownienne, D est une constante qui suit l'équation de Stokes-Einstein.

Nous pouvons aussi constater que nous retrouvons bien le coefficient de diffusion théorique $D = 11\mu m^2.s^{-1}$ issu de l'équation de Stokes-Einstein (Eq.2.2)

Distribution des angles

Le dernier paramètre que nous allons étudier sera la distribution des angles réalisée lors du mouvement des particules. Observons, dans un premier temps, la distribution des angles pour un intervalle de temps $\tau = 10ms$ et, dans un second temps, les probabilités d'aller vers l'avant p et vers l'arrière q en fonction de τ.

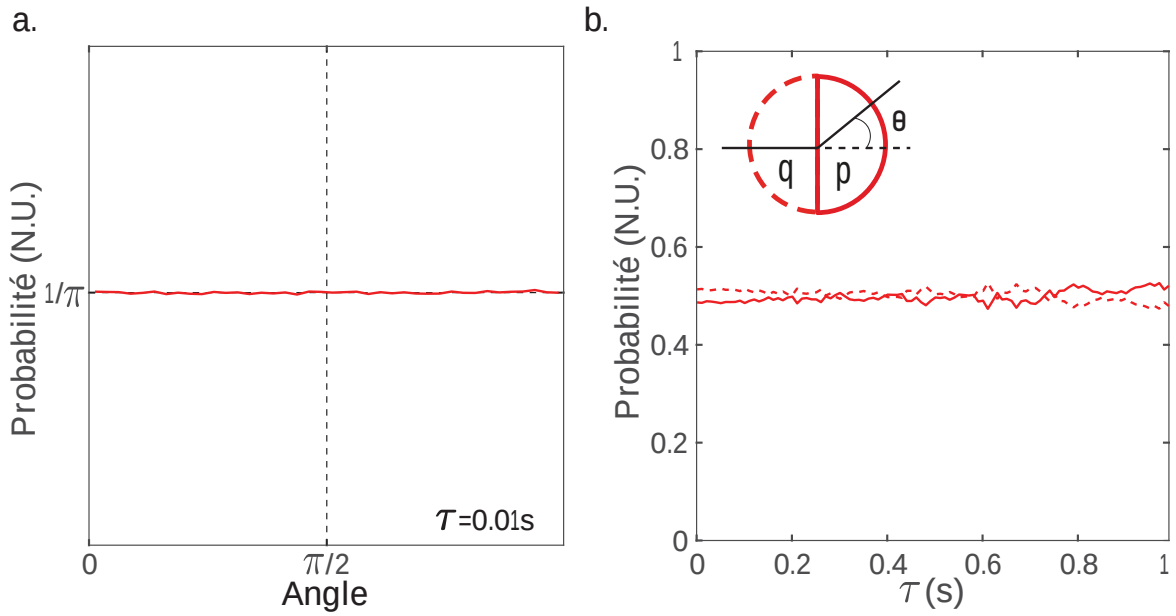


FIGURE 2.4 – a. Distribution des angles réalisée lors du déplacement des particules. b. Probabilité pour la particule d'aller en avant p ou en arrière q

Dans le cas d'un mouvement brownien, les particules ont autant de chances d'aller en avant qu'en arrière, nous obtenons donc une distribution des angles uniforme (Fig.2.4a). A partir de cette distribution, nous pouvons définir la probabilité de la particule d'aller vers l'avant, $p = \int_0^{\pi/2} P(\theta)d\theta$, ainsi que la probabilité de la particule de reculer, $q = \int_{\pi/2}^{\pi} P(\theta)d\theta$. Nous observons que $p = q = 1/2$ dans le cas du mouvement brownien, qui est bien aléatoire en déplacement et en orientation (Fig.2.4b).

Nous avons donc décrit dans cette partie le mouvement brownien théorique d'une particule de diamètre 40nm dans un liquide similaire à de l'eau, et avons défini des variables nous permettant de le caractériser. Nous allons maintenant étudier expérimentalement ces particules dans des cellules.

2.2 Mouvement des particules dans les cellules

Nous allons commencer par une approche simple, en comparant directement les résultats expérimentaux à notre simulation brownienne.

2.2.1 Un outil pour mesurer la diffusion dans les cellules : les GEMs

Comme décrit précédemment, nous allons utiliser des marqueurs développés récemment pour nos études : les GEMs (Genetically Encoded Multimeric nanoparticule) pour étudier la diffusion dans les cellules. Les GEMs sont des nanoparticules induites directement par les cellules grâces à des modifications génétiques. Tout comme les autres composants des cellules, les GEMs vont se déplacer librement dans celles-ci.

Nous allons comparer les résultats expérimentaux et théoriques issus d'une dynamique brownienne pour les différents paramètres présentés précédemment. Pour cela, nous allons nous servir de résultats obtenus lors de l'observation de simples cellules de *S. cerevisiae* placées dans un canal. Ces résultats seront considérés comme les résultats "contrôles" tout le long de cette étude, les cellules étant dans l'état de référence. Pour un seul film, des centaines, voire des milliers de trajectoires sont mesurées permettant ainsi d'avoir des distributions statistiques pertinentes.

2.2.2 Le retour des observables

MSD et coefficient de diffusion

Nous allons commencer par comparer les MSDs issues des trajectoires expérimentales avec celles obtenues à l'aide de la simulation brownienne.

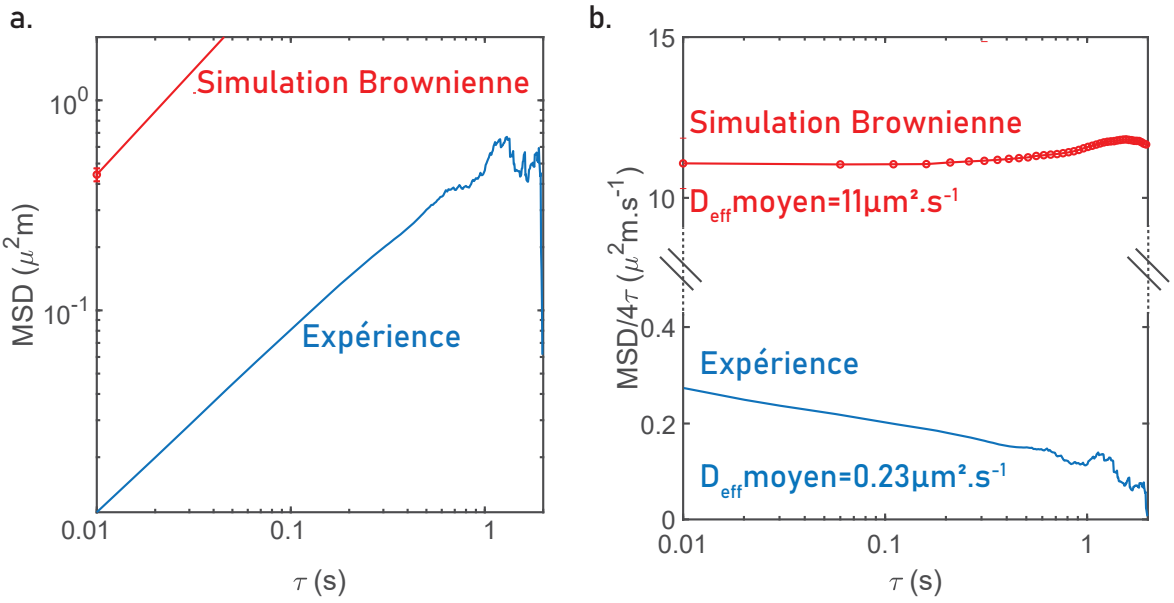


FIGURE 2.5 – a. MSD en fonction de l'intervalle de temps pour les trajectoires expérimentales (en bleu) et pour les trajectoires simulées (en rouge) b. Coefficient de diffusion en fonction de l'intervalle de temps expérimental (en bleu) et simulé (en rouge)

La première constatation est que les MSD pour les trajectoires expérimentales sont plus faibles que celles simulées (Fig.2.6a). Ceci indique une diffusion moins importante dans les cellules. De nouveau, nous observons l'influence des statistiques dans le calcul de la MSD. En effet nous constatons une fin de courbe très bruitée, ceci provient du fait que la MSD pour des temps d'observation long est moins définie mais aussi du fait que toutes les trajectoires suivies ne sont pas aussi longues, ce qui diminue encore plus la précision de la mesure.

Ainsi, le coefficient de diffusion extrait de la MSD est une moyenne de celui pour les intervalles de temps compris entre 10 et 100 millisecondes. Nous remarquons que le coefficient de diffusion moyen expérimental est lui aussi inférieur à celui simulé (Fig.2.5a), avec une valeur du coefficient

de diffusion moyen de $0.23+/-0.01\mu m^2.s^{-1}$. De manière intéressante, nous remarquons que $D(\tau)$, au contraire d'une dynamique brownienne, diminue avec τ dans les expériences (Fig.2.5b).

Nous pouvons conclure que la diffusion réelle est plus lente que celle prévue par la simulation. Cela pourrait être dû à une viscosité effective du milieu intracellulaire plus importante que celle de l'eau.

Trajectoire et distribution des déplacements

Nous allons analyser maintenant le déplacement en lui-même. Dans le cas de notre étude, nous étudions uniquement les déplacements dans le plan (x,y). Les variations en z sont négligeables car, lorsqu'elles sont importantes, la particule fluorescente sort de la tranche optique imagée en microscopie confocale et n'est plus visible.

Dans le cadre des trajectoires expérimentales, le pas de temps Δt n'est pas défini comme dans une simulation car le mouvement est continu. Cependant, l'intervalle de temps d'observation τ minimal sera un paramètre défini lors de l'acquisition. Ainsi, nous réalisons des films avec un temps d'acquisition de 10ms, et nous ne gardons que les trajectoires durant au maximum deux secondes afin de retirer les artefacts statistiques expérimentaux. L'intervalle de temps τ sera donc compris entre 10 ms et 2 secondes.

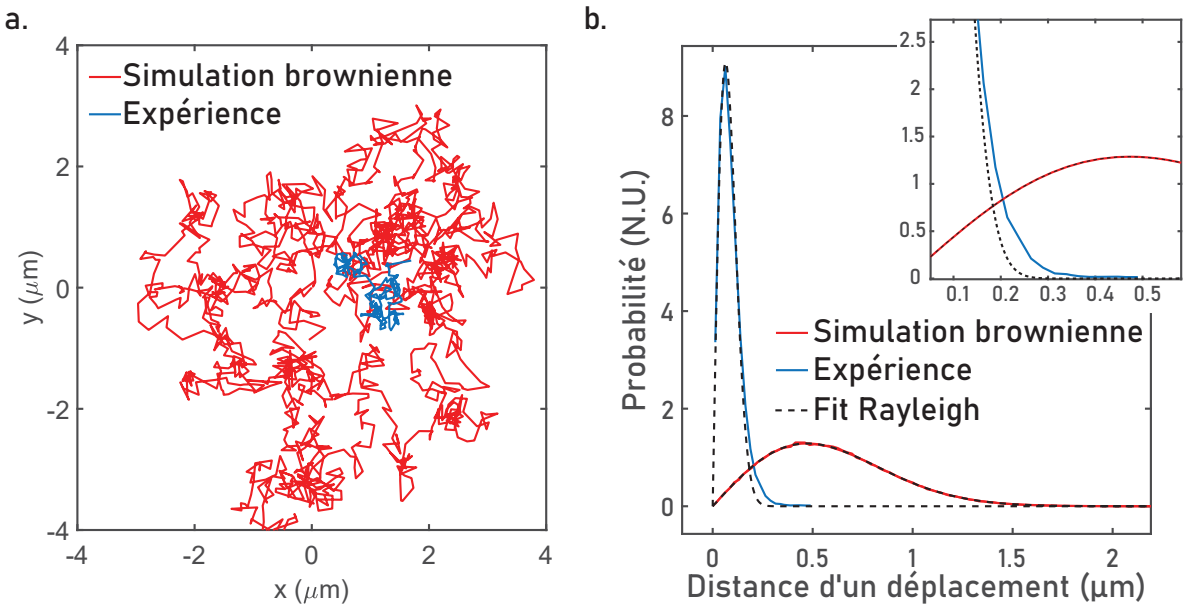


FIGURE 2.6 – a. Trajectoire d'une particule GEMs dans une cellule b. Distribution des déplacements pour l'ensemble des trajectoire analysées pour l'expérience et la simulation

La figure 2.6.a permet de comparer les trajectoires expérimentales et simulées acquises pendant 2 secondes.

Elles confirment le fait que le déplacement expérimental est plus court que celui attendu théoriquement si les particules diffusaient dans de l'eau.

De nouveau, ce comportement est confirmé avec l'analyse de la distribution des déplacements pour τ = 10 ms, tel qu'illustré sur la Fig.2.6.b. Les distributions sont très différentes avec notamment une valeur moyenne de déplacement plus faible pour l'expérience que pour la simulation.

Cependant, cette distribution nous apporte une autre information : la queue de la distribution expérimentale n'est pas bien ajustée par une fonction de Rayleigh. La diffusion dans la cellule ne correspond donc probablement pas à une dynamique brownienne, qui aurait pu s'effectuer dans un milieu plus visqueux que de l'eau.

Nous allons confirmer cela en étudiant la distribution des angles.

Distribution des angles

Le dernier paramètre étudié est la distribution des angles de chaque déplacement des particules.

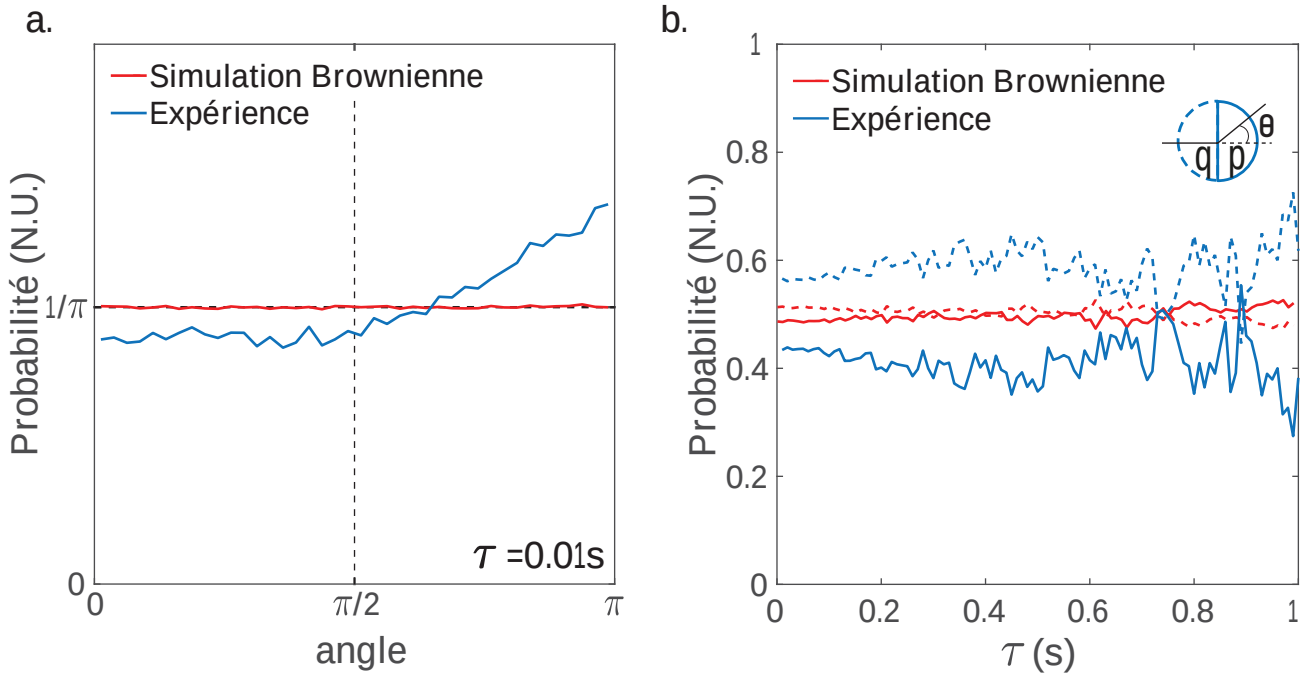


FIGURE 2.7 – a. Distribution des angles réalisées expérimentalement (en bleu) et en simulation (en rouge). b. Probabilité pour la particule d'aller en avant p ou en arrière q pour les résultats expérimentaux (en bleu) et pour la simulation brownienne (en rouge)

Nous constatons, à partir de la (Fig.2.7a), qu'il y a plus de trajectoires avec un angle supérieur à $\pi/2$, ce qui correspond à des mouvements de particules allant vers l'arrière. De manière intéressante, la probabilité reste uniforme entre 0 et $\pi/2$. Ceci se confirme lors du calcul des probabilités avec q supérieur à p tel qu'illustré sur la (Fig2.7b). Encore une fois, ce point ne peut pas être expliqué par une dynamique purement brownienne du mouvement, en accord avec les observations précédentes.

En conclusion, les particules ont une diffusion plus faible dans les cellules que dans la simulation brownienne. Cela peut s'expliquer avec une viscosité effective plus importante dans la cellule que dans l'eau, mais pas uniquement. Nous avons vu également que la diffusion dans les cellules n'est pas une diffusion brownienne car la distribution des angles n'est pas uniforme, certains mouvements reculant étant plus probable que les autres. Enfin, la distribution de taille de pas n'est également pas compatible avec dynamique purement brownienne.

Le déplacement de particules dans la cellule est donc plus complexe qu'un mouvement brownien classique. La partie suivante va proposer une modélisation plus pertinente du mouvement afin d'obtenir un résultat plus proche du résultat expérimental.

2.3 Simulation d'un colloïde de sphère dure

Notre hypothèse est que le mouvement des particules est bloqué par des encombrants de tailles proches de celle des GEMs, le tout évoluant dans un milieu dont la viscosité effective peut éventuellement être plus grande que celle de l'eau. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé une simulation pour vérifier si la seule présence d'encombrants peut justifier la diminution de la diffusion, et expliquer la dynamique observée.

Nous définissons l'encombrement par la fraction volumique des particules encombrantes, soit comme le rapport entre le volume occupé par l'ensemble des particules présentes dans notre système et le volume total du système.

Les objets les plus présents dans la gamme de taille de nos traceurs étant les ribosomes[30], nous avons simulé le déplacement d'une nanoparticule GEMs de 40 nm entourée de ribosomes, avec un déplacement brownien entre les ribosomes.

Cette simulation a été initiée en collaboration avec Jean-François Rupprecht à partir d'algorithmes développés dans la littérature [26, 107]. L'exploitation de cette simulation afin d'obtenir les résultats présentés dans les parties suivantes a été réalisée par Sylvain Goimard durant son stage de dernière année d'école d'ingénieur, stage que j'ai encadré. Seul le principe général de la simulation sera présenté dans cette partie et plus de précisions sur le fonctionnement seront données dans la partie méthode.

2.3.1 Création d'un modèle numérique

Principe

Le principe de la simulation consiste en la modélisation d'une cellule par une boîte contenant des sphères dures. Ces sphères représentent un traceur (GEMs) entouré d'encombrants (ribosomes). Comme cette simulation représente un sous-ensemble d'une cellule, nous allons considérer que les conditions au bord sont périodiques, ce qui nous évite de simuler un trop grand volume qui prendrait trop de temps de simulation. Ainsi si une particule sort de la boîte, elle réapparaitra de l'autre côté de celle-ci de façons à maintenir un encombrement constant. Le traceur ne sera donc pas confiné par les bords de la boîte.

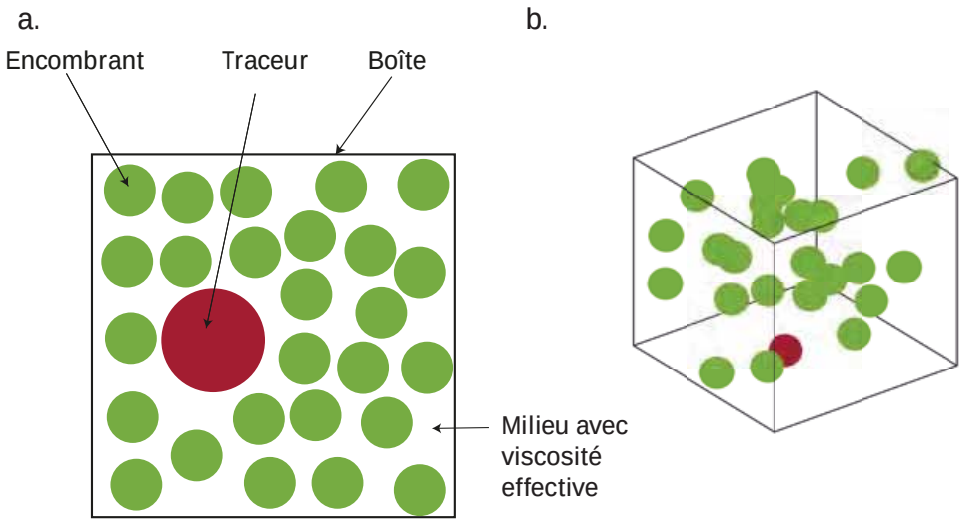


FIGURE 2.8 – a. Schéma en 2D des composants de la simulation b. Image de la simulation composée de 26 encombrants (en vert) et d'un traceur (en rouge) avec un encombrement de 0.2 dans une boite de 100 nanomètres de côté

Le déplacement de ces particules étant supposé brownien, nous calculons le déplacement à partir d'une gaussienne centré autour de zéro et de largeur de $\sqrt{2D_0\Delta t}$ dans chaque dimension.

Gestion des collisions

Cette simulation prend en compte la génération de collisions entre les sphères dures, qui arrive inévitablement au bout d'un temps (aléatoire) simulé.

La procédure de gestion des collisions est la suivante : chaque particule bouge l'une après l'autre ; si après avoir choisi les nouvelles coordonnées d'une particule, celle-ci est en contact avec une autre (Fig.2.9) nous dirons qu'il y a conflit et le mouvement de la particule sera refusé. Elle ne bougera ainsi pas de sa position initiale.

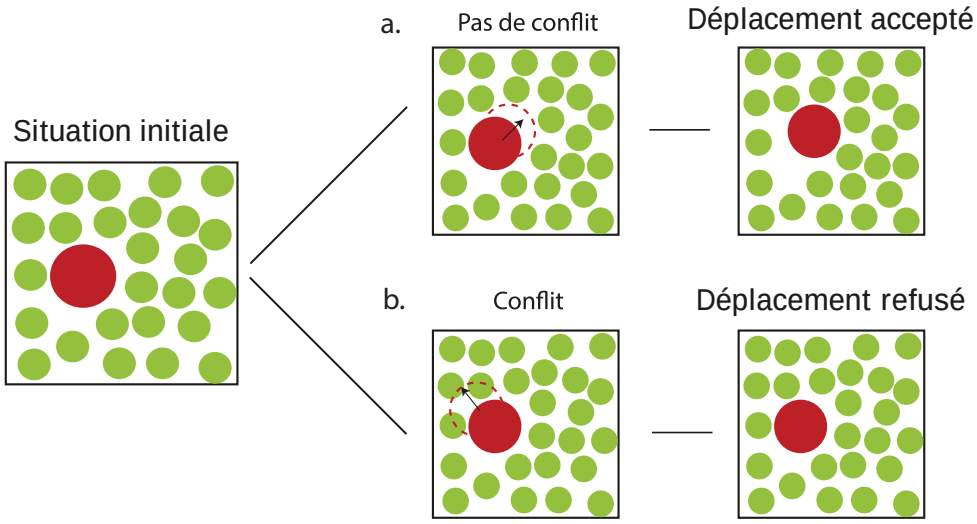


FIGURE 2.9 – Principe du déplacement dans la simulation a. Cas où il n'y a pas de conflit donc la particule se déplace. b. Cas où il y a un conflit donc la particule ne se déplace pas.

Limitations

Tout d'abord, la plus grande différence entre les données qui seront extraites de cette simulation et les données expérimentales est le temps d'acquisition. En effet, nous nous sommes aperçus après les premières simulations que nous obtenions des résultats différents lorsque nous faisions varier l'intervalle de pas de temps.

La présence des encombrants et des conflits associés entrainent l'obligation de travailler avec des intervalles de temps très faible, entre 10^{-6} s et 10^{-9} s selon les encombrements (cf. Méthode). Effectivement, lorsque l'encombrement augmente, il est possible d'avoir un effet "numérique" supplémentaire. Celui-ci vient de la méthode de déplacement des particules à partir d'une gaussienne dont l'écart type dépend de δt. Si cet intervalle de temps est grand, les déplacements proposés le seront aussi. Or, dans notre cas encombré, les grands déplacements sont plus susceptibles d'être interdits à cause d'un conflit. C'est pour cela qu'il est nécessaire lorsque nous augmentons la valeur de l'encombrement dans notre simulation de diminuer le pas de temps δt afin de limiter ces effets numériques(Fig.2.10

Le pas de temps d'acquisition, pour les films expérimentaux, est de 10ms. Ainsi, nous devons avoir entre 10 000 et 10 000 000 pas de simulation pour simuler un seul pas de temps expérimental. De plus, il est nécessaire d'avoir des trajectoires assez longues et/ou beaucoup de particules afin de limiter les erreurs statistiques. Cela entraine des temps de simulations pouvant aller de quelques heures à plusieurs jours.

L'optimisation du temps de simulation a été un des points principaux du stage de Sylvain Goimard. Malgré une diminution d'un facteur cinq du temps de simulation par rapport aux premières itérations, celle ci dure plusieurs jours : 20 jours de simulation sont nécessaire pour simuler 10 millisecondes avec un intervalle de temps de 10^{-9}s. Cela fais donc du temps de simulation la plus grande limitation et celui devra être pris en compte lors des comparaisons avec les résultats expérimentaux.

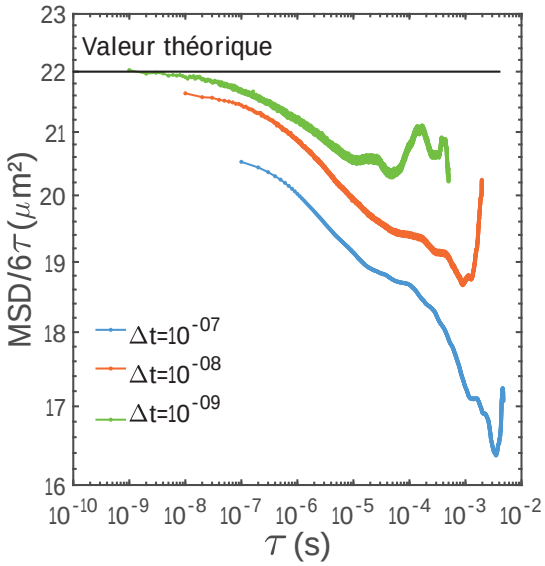


FIGURE 2.10 – Comparaison des MSD pour différents pas de temps

2.3.2 Validation des simulations

Nous avons dans un premier temps cherché à vérifier si nos résultats de simulation étaient cohérents avec la littérature. Pour ceci, nous allons mesurer le coefficient de diffusion en fonction de l'encombrement. En effet, la relation entre ces deux paramètres a été décrite théoriquement par l'équation de Smoluchowski-Einstein [108] dans le cas d'un milieu dilué de sphère dure et peut s'écrire :

$$D = D_0(1 - 2\phi) \tag{2.3}$$

ϕ étant la fraction volumique en sphères dures, définie comme le volume total occupé par celles-ci rapporté au volume du contenant. Nous remarquons d'abord que la présence d'encombrants limite la diffusion : $D(\tau)$ n'est plus constant mais diminue avec τ pour atteindre un plateau. Ce plateau, bien que bruité par un manque de statistique, correspond au coefficient de diffusion aux temps longs, ralenti, et prend en compte la présence d'encombrants.

Nous mesurons le coefficient de diffusion au niveau du plateau final de la simulation. Nous obtenons un bon accord entre les données issues de la simulation et la théorie (Fig. 2.11). Ceci nous conforte sur la qualité et surtout la validité de notre simulation de sphères dures, et nous permet de comparer cet effet aux expérimentations.

Nous pouvons, cependant, remarquer que les résultats de la simulation sont plus proches de la théorie pour les petites valeurs d'encombrements (Fig. 2.11). Nous supposons que cela est dû majoritairement à la diminution de la précision de la mesure du coefficient de diffusion sur les temps longs, comme évoqué au début de la partie. Une solution à l'étude est de continuer à optimiser la simulation, par des moyens techniques ou en changeant certaines méthodes : détection des conflits, condition aux bords, afin d'obtenir des simulations plus longues permettant ainsi d'améliorer la statistique du coefficient de diffusion.

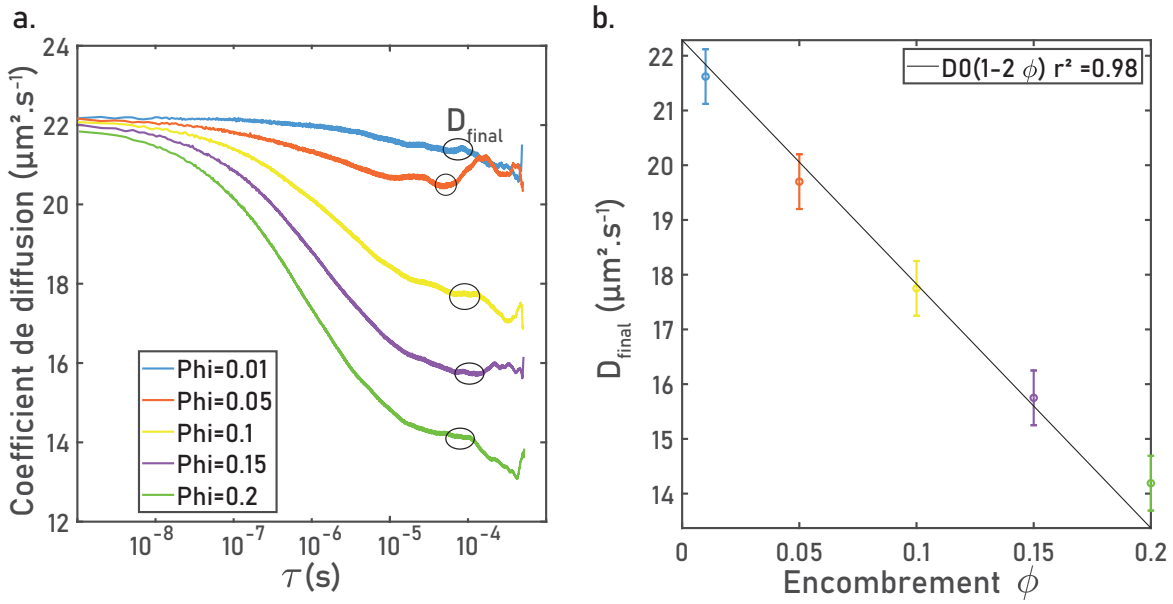


FIGURE 2.11 – a. MSD/6τ en fonction de τ pour différentes valeurs d'encombrements, les ronds noirs entourent le plateau final. b. Coefficient de diffusion du plateau final en fonction de l'encombrement déterminé dans le cas de simulations mono disperses.

2.3.3 Calibration

L'objectif de cette modélisation étant de comprendre la diminution de la diffusion obtenue dans nos expériences, les paramètres physiques de celle-ci sont calibrés par l'expérimentation.

Dans un premier temps, nous avons considéré un jeu de paramètres issu de la littérature. Les ribosomes sont représentés par des sphères de 20nm de diamètre [121] avec un encombrement ϕ de 0.2 [60].

Cependant, après les premières simulations, nous nous sommes rendus compte que ces paramètres pouvaient être optimisés.

L'expérience qui nous servira de repère est la mesure par cryo-électrotomographie de la concentration en ribosomes dans la cellule. Cette expérience a été réalisée dans la centrale Microscopie électronique de l'Institut Pasteur par Léa Swistak et analysée par notre collaborateur Franck Delavoie du CBI-Toulouse.

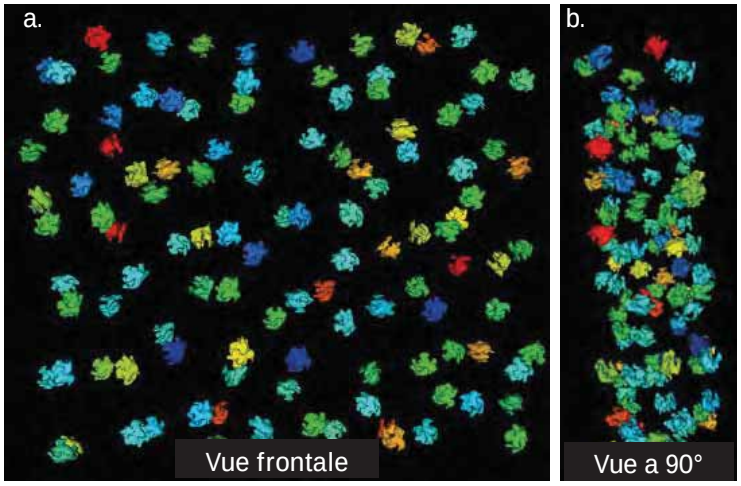


FIGURE 2.12 – Image reconstruite à partir d'une observation en cryoET a. Vue frontale b. Vue à 90 degré

Ces données expérimentales de CryoET (Fig.2.12) nous ont permis de mesurer une concentration en ribosome d'environ 17000 +/- 1000 ribosomes/ μm^3.

Nous avons également pu estimer à l'aide de nos simulation une taille effective de 14 nm pour les ribosomes considérés comme des sphères dures, et confirmer un encombrement de 0.20 +/- 0.01.

Pour terminer, le dernier paramètre que nous avons dû calibrer est la viscosité effective du milieu. En effet, en ne modélisant que les ribosomes et le traceur, nous avons exclu beaucoup d'autres composants de la cellule, et notamment les protéines. Celles-ci sont des objets beaucoup plus petits que les ribosomes et donc avaient été négligés en tant qu'encombrants, bien que nous pouvons estimer qu'elles occupent environ 5% du volume cytoplasmique.

Leur grande différence de taille, les protéines étant typiquement de l'ordre du nanomètre, provoque un ralentissement effectif du mouvement assimilable à une augmentation de la friction dans le milieu, correspondant à une augmentation de sa viscosité. Ainsi, la viscosité est plus élevée que celle de l'eau, et est estimée à 20 fois celle de l'eau à partir d'une étude récemment publiée [90] .

Nous allons voir dans la partie suivante que si l'on utilise les paramètres déduits de cette partie, les simulations seront assez représentatives des résultats expérimentaux.

2.3.4 Comparaison de la simulation de sphères dures et des expérimentations

Maintenant, nous allons comparer les mesurables précédemment définies de cette nouvelle simulation à ceux obtenus lors des expérimentations. Toutefois, comme précisé dans le début de cette partie, une attention particulière doit être donnée aux observables du à la différence de temps d'observation. Par exemple nous ne sommes actuellement en possession que de simulations d'une durée de 5 ms, or nous voulons comparer les coefficients de diffusion pour des intervalles de temps de 10 ms. De plus, il faut un nombre important de trajectoires afin d'avoir des statistiques correctes. Notre simulation doit donc aller au minimum jusqu'à 100 ms pour espérer avoir des résultats comparables aux expériences.

Trajectoire et distribution des déplacements

Nous commençons par observer le déplacement en lui-même. Nous constatons (Fig.2.13.a) que la trajectoire de la particule semble alternativement bloquée puis libre. Ce phénomène est lié à la présence des particules encombrantes qui peuvent former des "pièges" dans lesquelles le traceur est momentanément bloqué.

La distribution de pas, ne nous permet pas de conclure car les intervalles de temps d'observation sont trop différents. Dans notre simulation le taux d'observation le plus long pour lequel nous obtenons une distribution correctement définie est τ=0.1 ms soit 100 fois plus petit que celui des expériences. Nous allons donc devoir utiliser les autres mesurables pour comparer les simulations et les expériences.

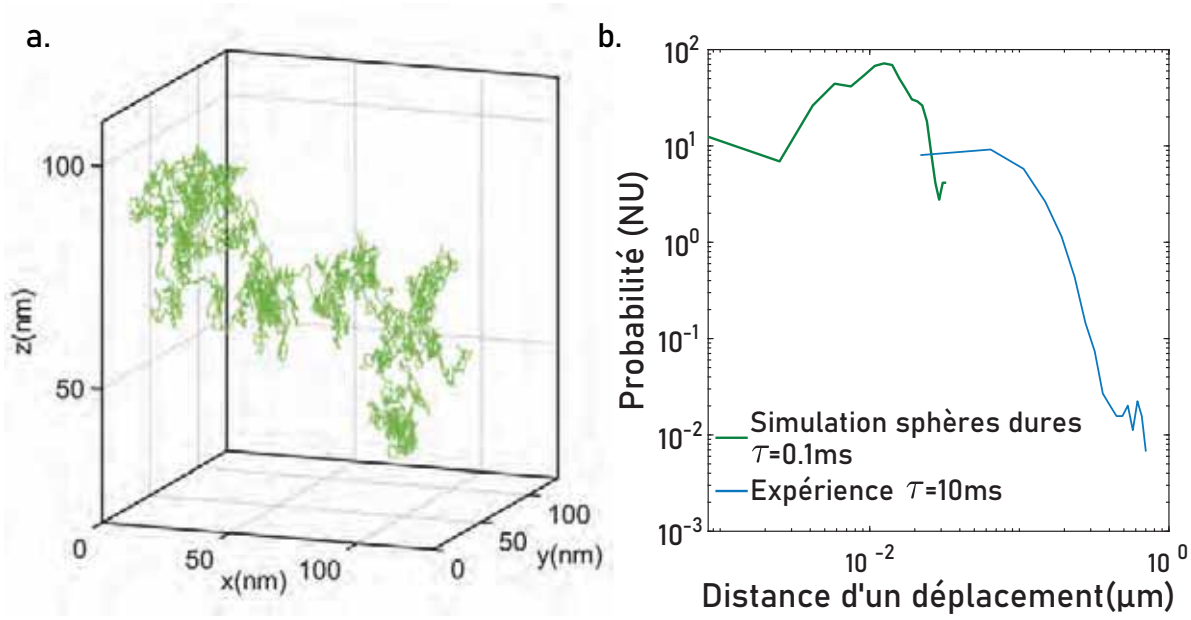


FIGURE 2.13 – a. Illustration du déplacement de la particule tracé pendant la simulation (Durée simulée 5ms, pas de temps 0.1μs. b. Probabilité des déplacements en fonction de l'intervalle de temps considéré

MSD et coefficient de diffusion

Comparons maintenant les MSD et coefficients de diffusion.

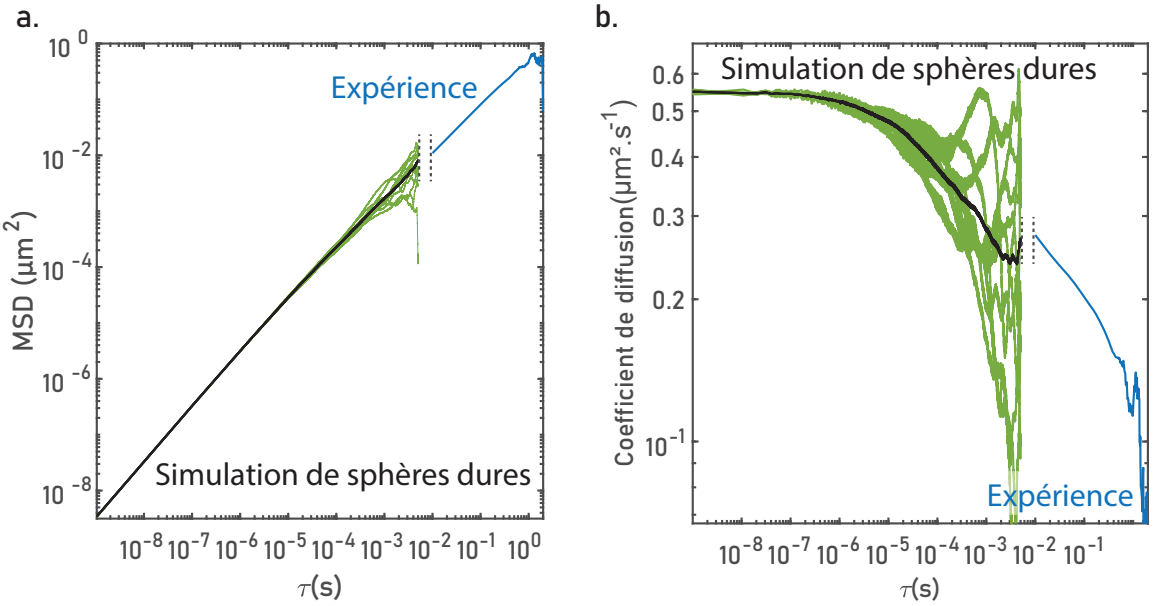


FIGURE 2.14 – a. MSD en fonction de l'intervalle de temps en vert pour les 10 simulations, en noir pour la moyenne et en bleu la courbe expérimentale. b. Coefficient de diffusion en fonction de l'intervalle de temps en vert pour les 10 simulations, en noir pour la moyenne et en bleu la courbe issue des expériences

Tout d'abord, nous constatons sur la Fig.2.14.a que la courbe MSD issue de la simulation est alignée avec celle des expériences. Ceci nous indique que le type de diffusion semble similaire entre la simulation et les données expérimentales. De plus, nous pouvons noter que la pente est similaire, ce qui suggère un coefficient de diffusion relativement similaire.

Regardons ensuite le coefficient de diffusion 3D : $D = \frac{MSD}{6dt}$ (Eq.2.1) représenté sur la Fig.2.14.b

Premièrement, nous constatons que pour les petits intervalles de temps nous retrouvons la valeur théorique du coefficient de diffusion selon l'équation de Stokes-Einstein 2.2, $D_{ini} = 0.55\mu m^2.s^{-1}$. Cela vient du fait que, pour les intervalles de temps les plus courts, il n'y a eu que très peu de conflits et donc que nous nous retrouvons dans la situation d'un mouvement brownien classique.

Nous remarquons aussi que la valeur finale du coefficient de diffusion est 0.24 $\mu m^2.s^{-1}$, proche de la valeur obtenue expérimentalement 0.23+/-0.05$\mu m^2.s^{-1}$, valeur toutefois obtenue pour τ =10 ms, mais qui ne devrait pas dépendre du temps si la dynamique du système est dominée uniquement par les encombrants.

En conclusion, les deux mesurables présentent une ressemblance forte entre les résultats expérimentaux et ceux issus de la simulation. Cependant, le manque de données nous empêche de conclure clairement sur cette similitude car le palier que nous nous attendons à voir dans la valeur du coefficient de diffusion est dans la zone que nous ne pouvons actuellement ni définir expérimentalement (nous ne pouvons pas imager plus vite) ni modéliser (temps de simulation trop long).

Distribution des angles

L'étude des angles a été réalisée pour différents pas de temps. Effectivement, comme pour le coefficient de diffusion, l'impact des encombrants n'est visible que pour des pas de temps suffisamment grands. Nous constatons ainsi qu'à partir des intervalles de temps de 10^{-6} s la distribution des angles de la simulation se rapproche de celle des expériences, mais reste uniforme en deçà. De plus, il est important de noter que plus les intervalles de temps sont grands, moins il y a de trajectoires, donc plus les courbes sont bruitées.

Nous pouvons aussi remarquer que lorsque nous regardons au petits pas de temps nous avons quasiment un mouvement brownien (car très peu de conflits).

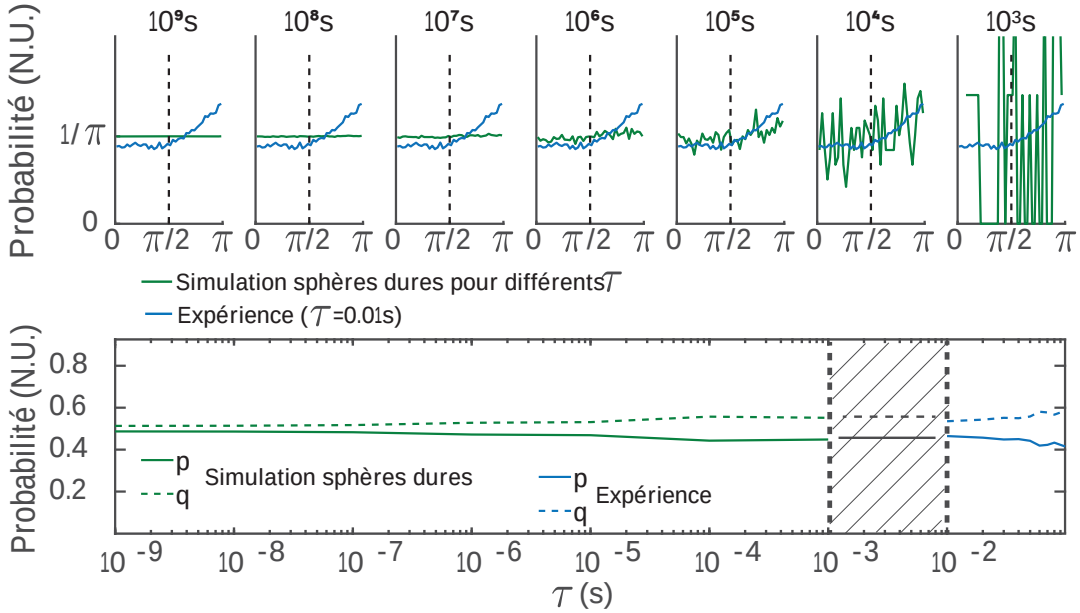


FIGURE 2.15 – a. Distribution des angles pour différents intervalles de temps τ b. Probabilité d'avancer p et de reculer q en fonction de l'intervalle de temps

Nous avons donc réussi à obtenir une simulation du déplacement des particules ayant une dynamique relativement similaire aux déplacements dans la cellule, et capable de générer des résultats relativement proches de ce que nous mesurons. L'intérêt de cette simulation est qu'elle est

calibrée selon des résultats expérimentaux et ne possède pas de paramètre libre. Une calibration de la viscosité sur nos cellules directement pourrait nous permettre d'être encore plus précis.

2.4 Conclusions et perspectives

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que le mouvement de particules à l'intérieur de cellules n'était pas un simple mouvement brownien. En effet, l'étude des trajectoires de celles-ci a montré une diffusion plus lente comparée à un modèle brownien classique ainsi qu'une distribution d'angles et de déplacements non compatibles avec cette dynamique. L'explication proposée est que la cellule n'est pas un milieu homogène et que l'impact de l'ensemble des éléments de la cellule, notamment les autres macromolécules, doit être pris en compte pour correctement comprendre le mouvement.

Afin d'avoir une meilleure représentation du déplacement de nos particules dans la cellule, nous avons proposé une simulation de sphère dures capable d'approcher ce type de déplacement. Cette simulation a été validée par des résultats théoriques avant d'être calibrée avec des résultats expérimentaux.

Une fois calibrée, elle permet de reproduire le mouvement des particules de façon correcte.

Cette simulation a néanmoins besoin d'améliorations par rapport à son temps de calcul, principale cause des imprécisions et de la difficulté de comparaison avec les données expérimentales.

Perspectives

Une fois cette simulation validée, elle pourra servir à tester des hypothèses variées sur la diffusion dans la cellule telles que l'impact de l'activité sur la diffusion. Celle-ci pourra être étudiée de plusieurs façons : en étudiant l'impact d'un changement local de température effective, ou en rajoutant des échanges thermiques entre les particules, comme par exemple dans la ref. [56]. Une autre perspective est le rajout de réactions chimiques entre les particules et donc l'observation de l'impact de l'encombrement sur celles-ci (Fig.2.16.a). Par ailleurs, une étude avec contraintes sur la trajectoire des particules permettrait d'étudier l'impact que pourrait avoir de plus gros objets, tels que des organelles, sur la diffusion (Fig.2.16.b).

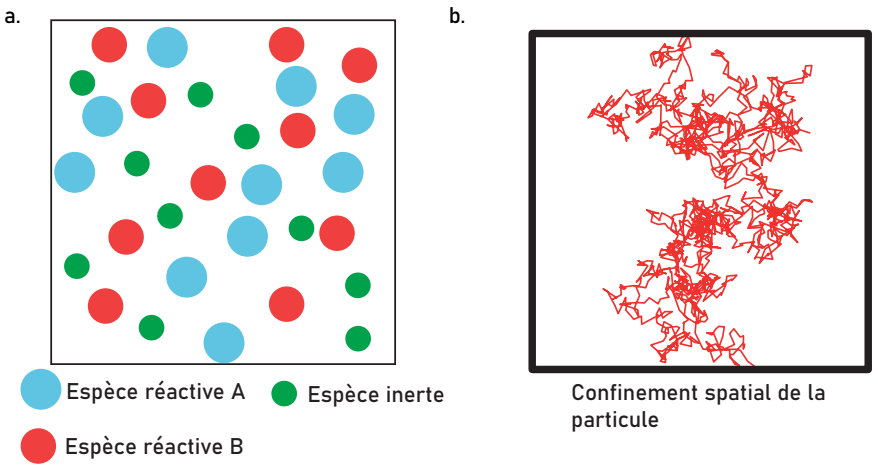


FIGURE 2.16 – Schéma du principe de la simulation pour a. Le rajout de réaction chimique, b. Un confinement spatial de la particule

Ce dernier point est en effet peut-être à l'origine de la diminution de $D(\tau)$ aux temps longs (secondes) observée expérimentalement. En 1s, et avec $D \sim 0.25\mu m^2/s$, la particule parcourt une trajectoire d'environ $\sqrt{D\tau} = 500nm$, ce qui est suffisant pour ressentir les gros organites ou le bord de la cellule. Or, si une trajectoire est confinée, le coefficient de diffusion aux temps longs tend vers 0 [72].

Après avoir étudier la diffusion des particules dans la cellule, nous allons voir comment ce mouvement dans les cellules peut être impacté par différentes contraintes et comment l'on peut expliquer ces effets.

Chapitre 3

Effet du confinement sur l'encombrement dans la cellule

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la large concentration en macromolécules dans les cellules a un impact sur la diffusion à l'intérieur de celles-ci. Nous allons maintenant étudier l'impact de la pression induite par la croissance sur cette diffusion.

Dans un premier temps, nous allons expliquer notre méthode de confinement et de mesure de la pression induite par la croissance à l'aide d'un système microfluidique. Puis nous expliciterons le lien entre cette pression et la pression de turgescence. Ceci nous amènera à étudier comment des chocs osmotiques impactent la diffusion dans la cellule. Puis nous verrons que la pression induite par la croissance entraine aussi des modifications de la diffusion dans la cellule. L'origine de ces modifications sera étudiée dans la dernière partie de ce chapitre.

3.1 Méthode de mesure et origine de la pression induite par la croissance

Nous avons vu dans l'introduction que lorsque les cellules sont placées dans un espace confiné, elles développent une pression capable de déformer leur environnement[31]. Nous allons donc voir dans un premier temps comment cette déformation nous permet d'accéder à la pression développée par les cellules.

3.1.1 Pression induite par la croissance dans des puces microfluidiques

Avant d'étudier l'effet du confinement sur les cellules, nous utilisons un design de puce microfluidique développé précédemment [31]. Ce design a été utilisé pour fabriquer un moule sur un wafer de silicium sur lequel nous avons coulé du PDMS (Polydiméthylsiloxane), un polymère flexible, transparent et biocompatible. Nous avons ensuite fabriqué à partir du PDMS moulé des puces microfluidiques à l'aide d'un collage plasma O_2 et d'une lamelle de verre. Pour terminer, ces puces seront remplies avec les cellules et observées en microscopie.

Pour le remplissage, la puce dispose de deux entrées indépendantes, chacune menant à 32 chambres (Fig.3.1.1.a.). Les cellules vont être placées dans ces chambres afin de proliférer dans un espace confiné (flèches vertes). L'alimentation en milieu nutritif est réalisée (flèches bleues) au travers de canaux de petites dimensions (1µm x 1µm) évitant ainsi la fuite des cellules au travers de ceux-ci.

Une fois la chambre pleine, les cellules vont générer de la pression de croissance, pousser sur les parois élastiques et vont commencer à déformer la chambre (Fig.3.1.1.b). Cette déformation va fermer la pince en haut de la chambre (flèches rouges) qui va clamper l'entrée de celle-ci et donc empêcher les cellules de sortir. Cette particularité est à l'origine du nom de ce design : "Self-Closing", car cette valve est actionnée par la croissance des cellules, sans besoin de contrôle externe.

Nous observons donc ensuite une déformation des parois en PDMS de la chambre (Fig.3.1.1.b) causée par la pression développée par les cellules. La pression et la déformation étant proportionnelle, nous obtenons la valeur de la pression en mesurant la déformation (flèches oranges) et en multipliant cette valeur par un facteur de calibration (l'obtention de ce facteur sera décrit dans la partie méthode).

Avant d'expliquer l'origine de cette pression nous allons définir le concept de pression osmotique, qui lui est intrinsèquement relié.

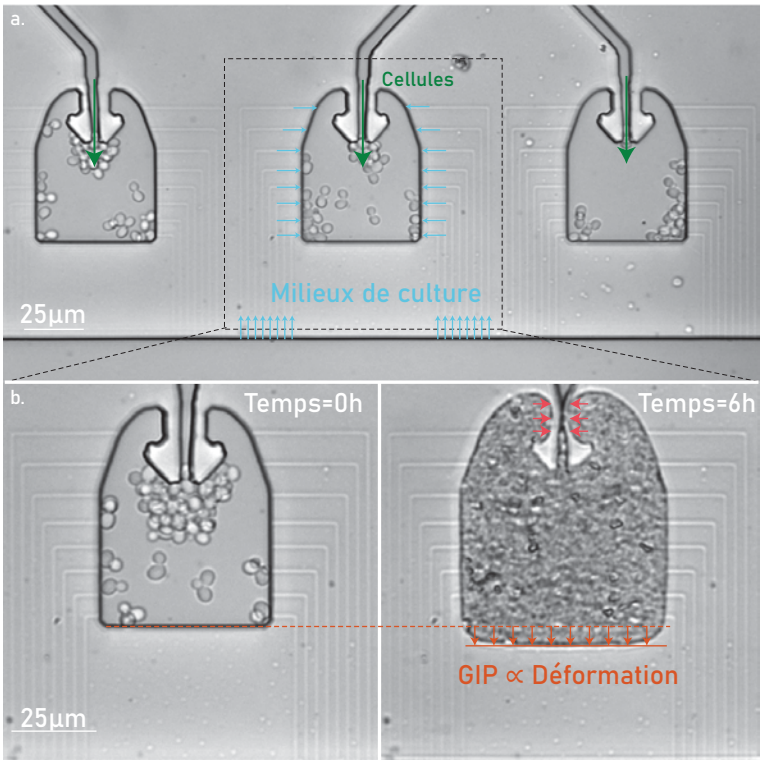


FIGURE 3.1 – a. Image de trois chambres appartenant à une puce SC. b. Illustration de la méthode de détermination de la pression induite par la croissance en mesurant la déformation des chambres.

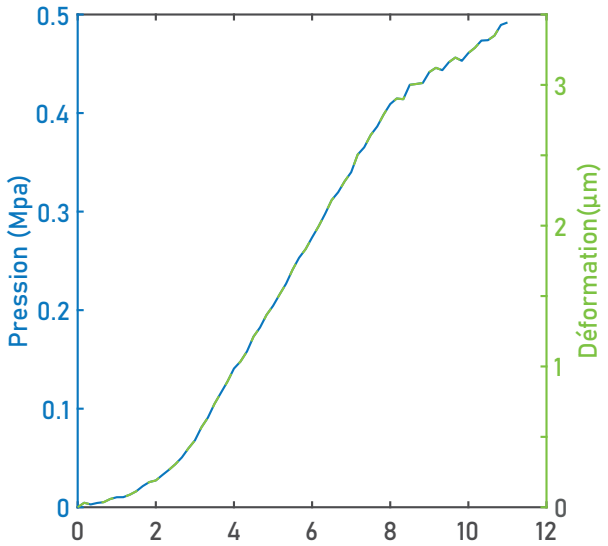


FIGURE 3.2 – Déformation et pression déduite de celle-ci en en fonction du temps en heure

3.1.2 Définition de la pression osmotique

La pression osmotique apparait lorsque deux milieux de concentrations différentes en une espèce sont séparés par une membrane perméable uniquement à l'eau et non à cette espèce. Une partie de l'eau du milieu le moins concentré se déplace de l'autre côté, afin d'équilibrer les potentiels chimiques. Ceci crée une différence de niveau d'eau entre les deux côtés, qui va entrainer une différence de pression proportionnelle à la différence de niveau d'eau selon la loi de l'hydrosta-

tique (Fig.3.3.a). C'est cette pression hydrostatique équilibrant les potentiels chimiques que l'on appelle pression osmotique.

Dans les cas des cellules, la différence de concentration a lieu entre le milieu de culture et la cellule. Naturellement, la cellule est plus concentrée que le milieu. Ceci dit, si la concentration du milieu augmente, on parlera de choc "hyper-osmotique", et inversement si la concentration dans le milieu de culture diminue, on parlera alors de "choc hypo-osmotique". Dans les deux cas il y aura un changement dans le volume de la cellule par mouvement d'eau, visant à équilibrer le système (Fig.3.3b)[127][28]. Ce changement de volume peut se faire à concentration de macromolécules constante, si bien qu'un choc osmotique peut moduler l'encombrement macromoléculaire en imposant des mouvements d'eau.

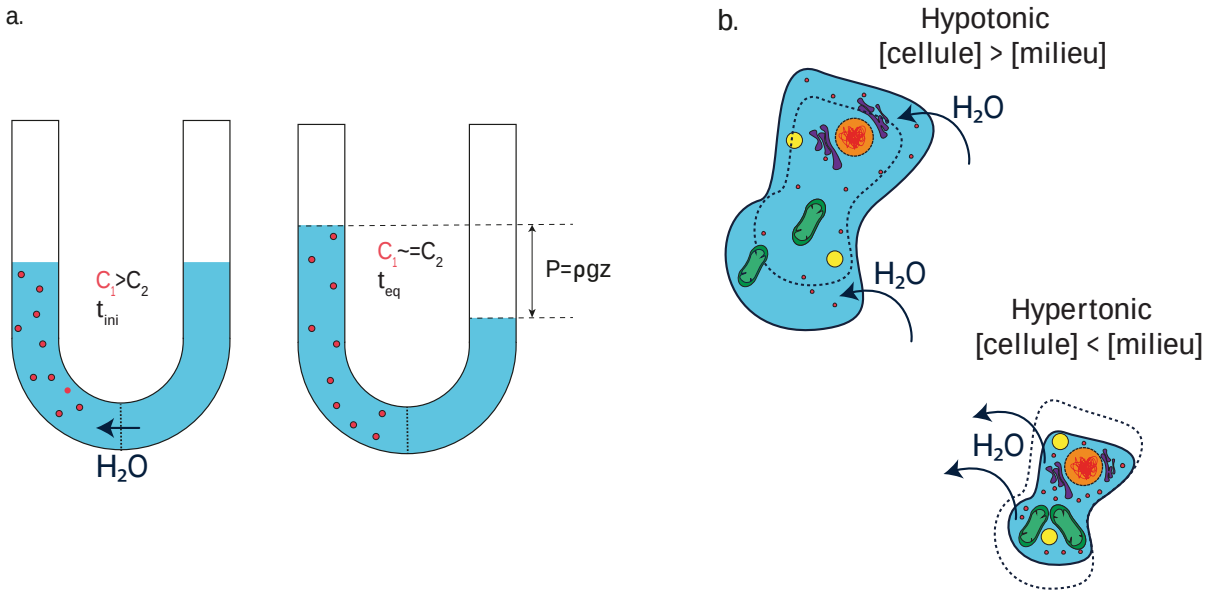


FIGURE 3.3 – a. Illustration de la pression osmotique dans le cas général. b. Illustration de la pression osmotique appliquée à la cellule.

Cependant les cellules, et particulièrement notre sujet d'étude *S. cerevisiae* [1] [54], sont capables d'équilibrer leurs concentrations en osmolytes au cours du temps grâce à leur capacité à échanger de l'eau avec le milieu extérieur et grâce à leur capacité de production en osmolytes tels que le glycérol.

L'observation des modifications de l'encombrement va donc devoir se faire rapidement après le choc osmotique ou en utilisant des cellules mutantes incapables de s'adapter à cette pression osmotique (tels que les mutants avec le gène *HOG1* muté qui sont connus pour avoir des limitations dans leur capacité à s'adapter aux chocs osmotiques [16]).

3.1.3 La pression de turgescence : une pression d'origine osmotique

Le principal composant des cellules est l'eau. Cette eau va être responsable du volume de la cellule. Prenons comme comparaison un ballon de baudruche lorsqu'il est vide. Son volume est alors quasiment nul, or lorsque nous le remplissons d'eau, celui-ci va pousser les parois du ballon est donc augmenter son volume. L'eau applique alors une pression hydrostatique sur les parois dirigée vers l'extérieur, et qui est équilibrée par la tension de la paroi élastique.

Dans les cellules, cette pression est appelée pression de turgescence. Cette pression est liée à la quantité d'eau présente dans la cellule, et va pousser sur la paroi de la cellule afin de maintenir leurs formes à l'équilibre (Fig.3.4.a). Or nous venons de voir que des changements osmotiques entraînent des mouvements d'eau. Donc la pression de turgescence va dépendre de la pression

osmotique interne de la cellule. Si celle-ci est plus grande que le celle du milieu, de l'eau va entrer dans la cellule augmentant ainsi la pression de turgescence et, inversement, si la pression osmotique interne est plus faible, de l'eau va sortir de la cellule, diminuant ainsi la pression osmotique.

Cependant, comme la croissance et la division cellulaire sont des procédés coordonnés dans la cellule, les cellules croissent avant de se diviser. Pour ce faire, elles vont développer une pression sur leurs parois cellulaires afin d'hydrolyser du matériel de mur cellulaire, permettant l'augmentation de leur volume. Pour cela, elles vont augmenter leur pression osmotique en se concentrant en osmolytes et ainsi augmenter leur pression de turgescence (Fig.3.4.b).

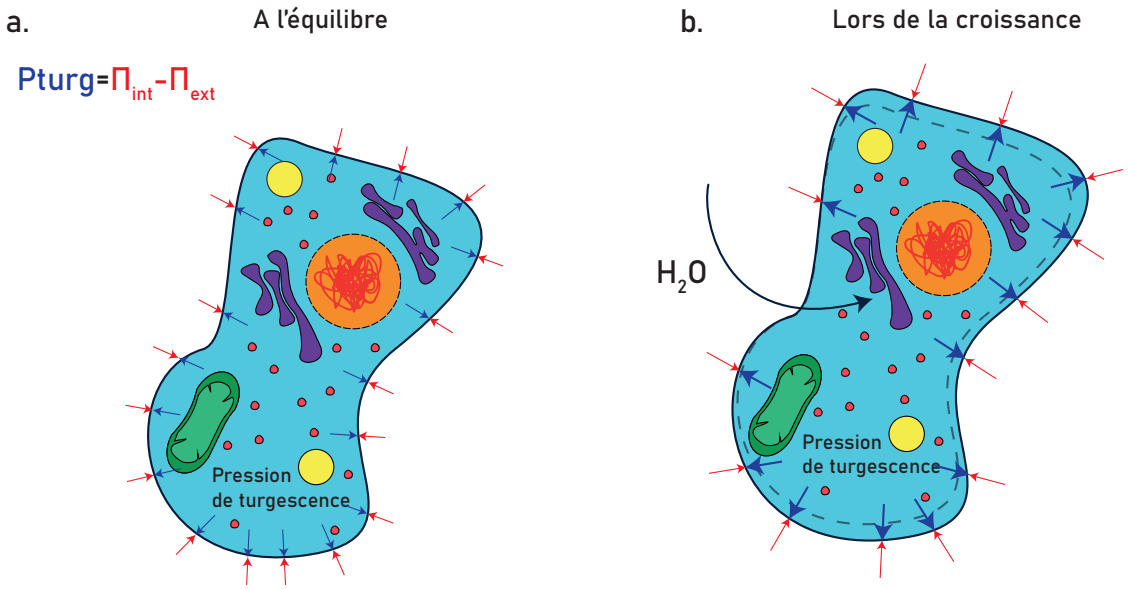


FIGURE 3.4 – a. Schéma de la pression de turgescence poussant sur les parois d'une cellule à l'équilibre b. Schéma de la pression de turgescence poussant sur les parois d'une cellule lors de la croissance de celle-ci

Comme nous allons le voir par la suite, cette pression de turgescence est intrinsèquement reliée à la pression de croissance. Cette pression étant d'origine osmotique, nous allons commencer par étudier l'impact de chocs osmotique sur les cellules.

3.1.4 Impact de chocs osmotiques sur les cellules

Pour effectuer des chocs osmotiques sur des cellules, nous allons les placer dans un environnement hyperosmotique. Pour cela, nous utilisons un mélange entre notre milieu de culture classique et du sorbitol, un sucre très peu métabolisable par nos cellules (Cf. Méthode).

Nous analysons deux paramètres en particulier : le volume des cellules, afin de voir expérimentalement l'effet d'un choc hyper-osmotique, et la diffusion dans les cellules subissant ces chocs osmotiques, pour mesurer l'effet d'une augmentation de l'encombrement.

Pour la mesure du volume nous allons utiliser une souche avec le cytoplasme marqué par une protéine fluorescente (Fig.3.5.a). Nous allons ensuite évaluer le volume des cellules à l'aide d'une reconstruction 3D (Fig.3.5.b) réalisée à partir d'une acquisition au confocal d'un Z-stack. La reconstruction est réalisée en utilisant des scripts FIJI et Matlab développés spécifiquement pour cette étude.

Nous observons une diminution du volume en fonction de la concentration en sorbitol (Fig.3.6). Cette diminution était attendue et est similaire à ce qui peut se retrouver dans la littérature [91]. Il est important de rappeler que, comme précédemment précisé, ces mesures se font juste après le

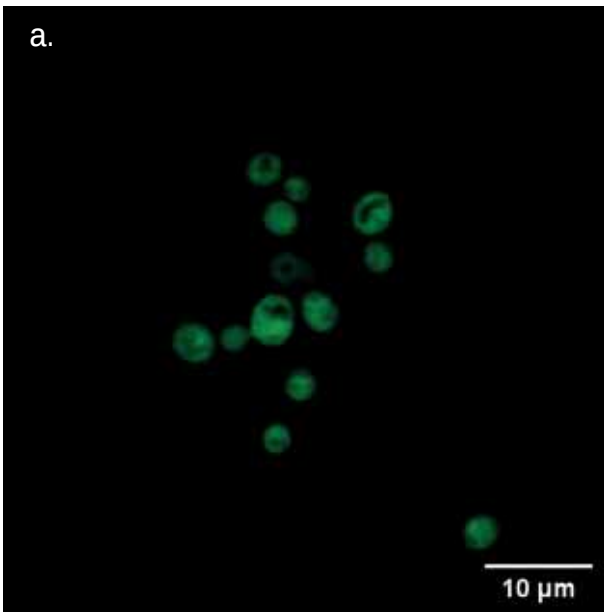


FIGURE 3.5 – a. Mesure du volume des cellules en utilisant un marquage cytoplasmique

choc osmotique (maximum cinq minute après le choc), et donc à un moment où les cellules n'ont pas eu le temps de s'adapter.

Nous nous retrouvons donc dans un cas où le volume de la cellule change rapidement sans pour autant modifier sa composition (Fig.3.6). Ceci implique donc une augmentation des concentrations internes de la cellule, ce qui va entrainer une diminution de la diffusion dans les cellules[43][73].

Nous mesurons la diffusion dans les cellules en utilisant la souche présentée précédemment qui induit les GEMs cytoplasmique de 40nm, et traquons les particules pour déterminer le coefficient de diffusion de leurs mouvements (Fig3.6.b.). Nous pouvons effectivement constater une diminution de la diffusion en fonction de la concentration en sorbitol.

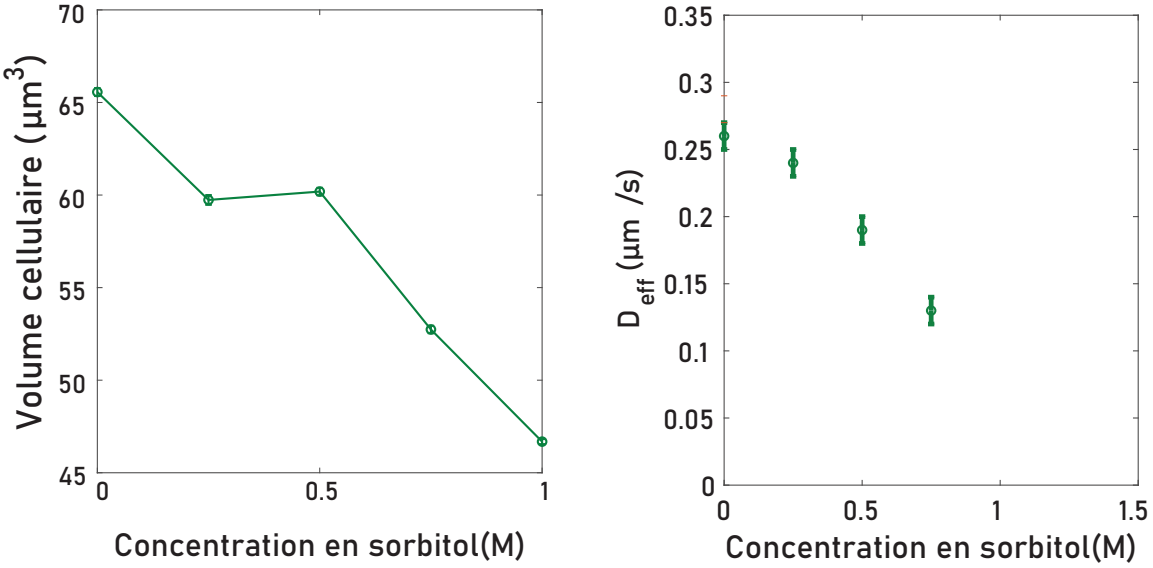


FIGURE 3.6 – a.Volume des cellules pour une différente valeur de chocs osmotiques b.Coefficient de diffusion du déplacement des GEMs dans le cytoplasme pour une différente valeur de chocs osmotiques

Nous venons de voir que lorsque des cellules sont soumises à des chocs hyper-osmotiques,

leur volume diminue et entraine avec lui une diminution de la diffusion. Nous allons étudier dans la partie suivante si un mécanisme similaire est observé lorsque les cellules sont confinées et développent de la pression induite par la croissance.

3.2 La pression induite par la croissance modifie la diffusion dans les cellules

Nous allons utiliser le dispositif présenté plus tôt pour confiner les cellules qui vont ainsi développer une pression sur leur environnement lors de leur croissance. Nous allons ensuite, comme précédemment, mesurer le volume cellulaire en fonction de cette pression puis la diffusion.

3.2.1 Pas de variation du volume cellulaire sous pression, mais une diminution de la diffusion

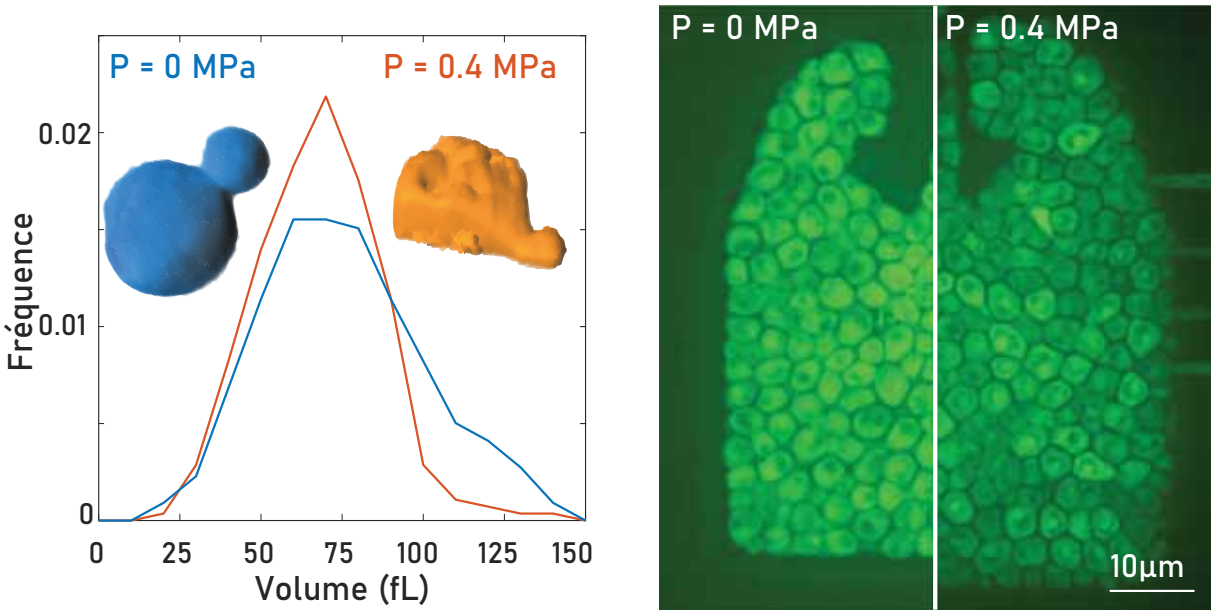


FIGURE 3.7 – a.Volume du cytoplasme des cellules pour différente valeur de GIP (en bleu pas de pression , en orange avec 0.4 MPa de pression) b. Image du système expérimental

Nous comparons les cellules dans deux conditions : dans une chambre sans pression (début d'expérience) et dans une chambre dans laquelle les cellules ont développé une pression de 0.4MPa (après environ 12 h de croissance confinée).

Nous pouvons constater que la distribution des volumes, lorsque les cellules sont sous pression, ne change pas de manière significative (Fig3.2.1). Ce résultat est différent de ce que nous avons trouvé pour les chocs osmotiques. Cependant cela s'explique par le fait que, contrairement à l'étude de l'impact des chocs osmotiques, nous observons des cellules en croissance et donc, comme précisé précédemment, qui augmentent leur volume pour se diviser. La pression développée est donc inhérente à leur développement.

Observons ensuite l'évolution de la diffusion pour cette même pression mécanique induite par la croissance. Nous pouvons constater que, comme pour les chocs osmotiques, la diffusion des GEMs de 40nm de diamètre diminue en fonction de la pression de croissance (Fig.3.8.a). Nous avons également étudié des particules d'autres tailles : des GEMs de 20nm, et des particules d'ARN messager, qui sont détaillés dans la référence suivante [30]. Nous pouvons aussi constater que cette diminution est exponentielle et dépendante de la taille des particules observées, les plus grandes particules étant plus impactées que les plus petites (Fig.3.8.b). La diminution de la diffusion semble suivre une loi exponentielle pour toutes les particules. Cette loi peut être déduite de l'équation de Doolittle, la description de ce modèle ainsi que son implication sont développés dans l'article (cf. annexe) écrit durant ces travaux de thèse.

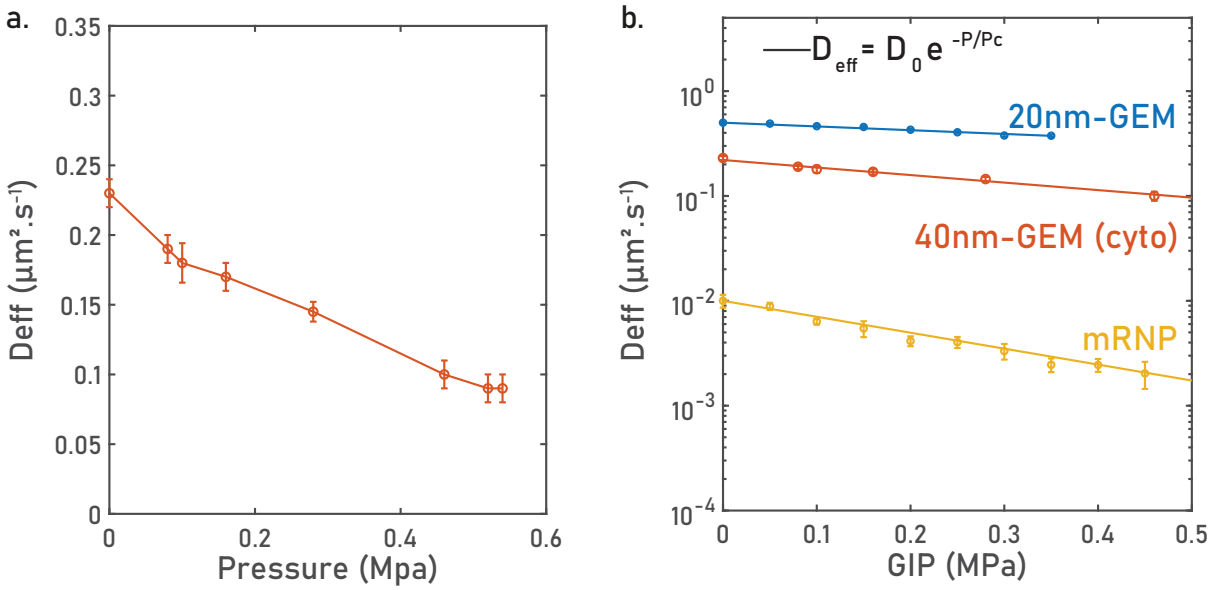


FIGURE 3.8 – a. Coefficient de diffusion du déplacement des GEMs de 40nm de diamètre dans le cytoplasme pour différentes valeur de GIP b. Comparaison des coefficients de diffusion en fonction de la GIP pour des particules de différentes tailles avec en ligne pleine le modèle exponentiel.

Malgré le fait que la distribution des volumes des cellules ne change pas, nous trouvons une diminution de la diffusion dans les cellules similaire à celle observée durant des chocs osmotiques. Ceci indique donc une augmentation de l'encombrement des cellules.

3.2.2 La pression de croissance est liée à une augmentation de la pression interne dans les cellules

Comme précisé précédemment, la pression de turgescence est une pression hydrostatique et est liée à la différence de pression osmotique entre l'intérieur de la cellule et le milieu de culture. Ainsi, pour développer cette pression, la cellule a besoin d'accumuler des osmolytes. **Posons comme hypothèse que l'accumulation d'osmolyte est proportionnelle à la création de macromolécules.** Cette hypothèse est justifiée en croissance équilibrée : les cellules augmentent leur volume (croissance) au même rythme qu'elles augmentent la quantité de macromolécules, ce qui permet de conserver une densité dans le cytoplasme constante. Comment ce couplage est réalisé est ceci dit encore inconnu à ce jour.

Dans le cadre de cette hypothèse, notre observation qu'une diminution de la diffusion, synonyme d'une augmentation de la concentration en macromolécules (à volume constant ici), entraine qu'il doit y avoir une augmentation également de la concentration en osmolytes, qui aug-

menterait la pression osmotique interne. Cette augmentation de pression interne pourrait être la pression mécanique de croissance mesurée dans la chambre.

Pour vérifier si la concentration en osmolytes augmente de manière similaire à la concentration en macromolécules pendant la génération de pression de croissance, nous allons mesurer le changement du volume et de la diffusion après une relaxation des contraintes grâce à un dispositif appelé "puce Abate" détaillé dans les Méthodes en fin de manuscrit (Fig.3.9.a). Brièvement, il consiste en une pince élastique qui est mise sous pression afin de fermer deux membranes sur le canal d'entrée (fléches jaunes Fig.3.9.a), limitant ainsi la sortie des cellules. Pour relaxer la pression de croissance, il suffit de relâcher la pression appliquée sur la pince, diminuant la densité de cellule et la pression accumulée sous confinement.

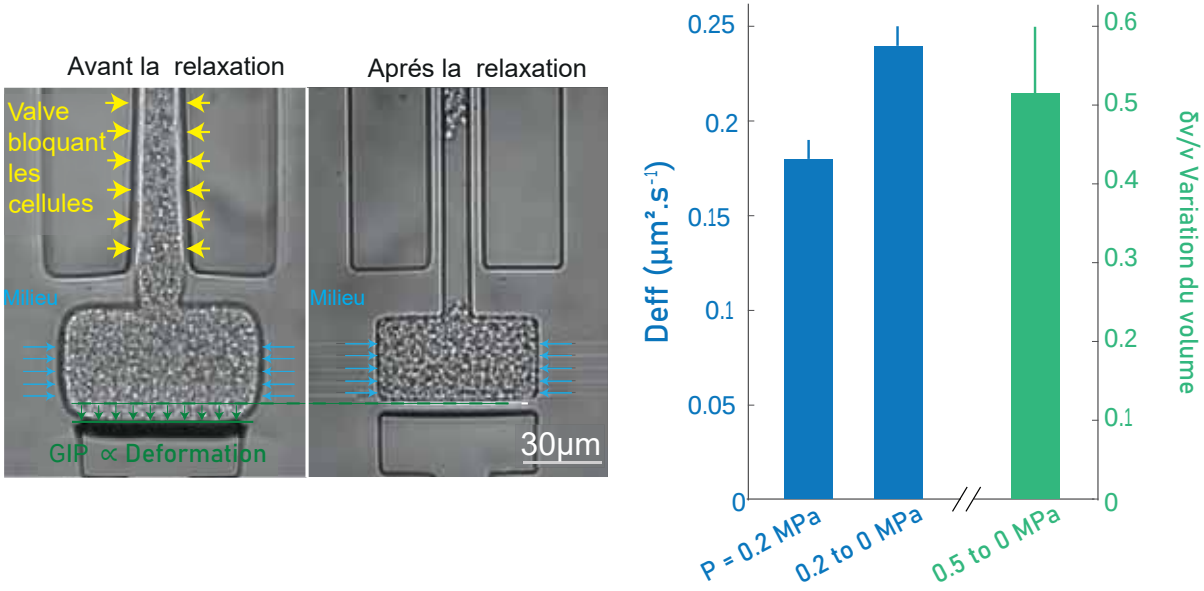


FIGURE 3.9 – a. Schéma du fonctionnement de la puce "Abate", les flèches jaunes représentent la pince qui permet de fermer la chambre, les flèches bleues le milieu de culture et en vert l'illustration de la mesure de déformation de la chambre. L'image de gauche représente une puce fermée dans laquelle les cellules ont poussées pendant 16h et celle de droite la même chambre juste après l'ouverture de la pince. b. Volume et diffusion cellulaire avant et après relaxation

Nous pouvons constater que le volume des cellules augmente d'environ 50% après relaxation (Fig.3.9.a), ce qui confirme bien la présence d'une pression de turgescence plus élevée que sans pression, qui va augmenter le volume cellulaire dès que les contraintes externes sont relâchées.

Nous pouvons aussi constater une augmentation de la diffusion, qui revient presque à une valeur normale de diffusion après relaxation ce qui indique une diminution directe de l'encombrement. Nos observations sont donc réversibles et pointent vers le mécanisme suivant : sous confinement, les cellules semblent accumuler des osmolytes, à l'origine de la pression de croissance, et des macromolécules, à l'origine de l'augmentation de l'encombrement, et ceci à volume presque constant.

Nous venons donc de voir que malgré le fait que le volume des cellules ne change pas lorsqu'elles subissent la pression induite par la croissance, elles vont quand même s'encombrer. Cet encombrement, par-delà la diminution de la diffusion, peut également avoir un autre impact : une augmentation de la pression colloïdale, par les macromolécules elles-mêmes, qui peut impacter le volume de certaines organelles, comme le noyau.

3.2.3 L'augmentation de l'encombrement est relié à une diminution du volume nucléaire

Afin de confirmer les résultats précédents et de vérifier que nos hypothèses sont valides dans l'ensemble de la cellule, nous allons maintenant analyser le volume du noyau des cellules à l'aide d'un autre marquage maintenant spécifique au noyau de la cellule (marquage de la protéine Nup47 avec une protéine fluorescente mCherry, qui marque les pores nucléaires et par extension le noyau).

La première métrique que nous allons mesurer est le volume du noyau dans le cas de la pression induite par la croissance.

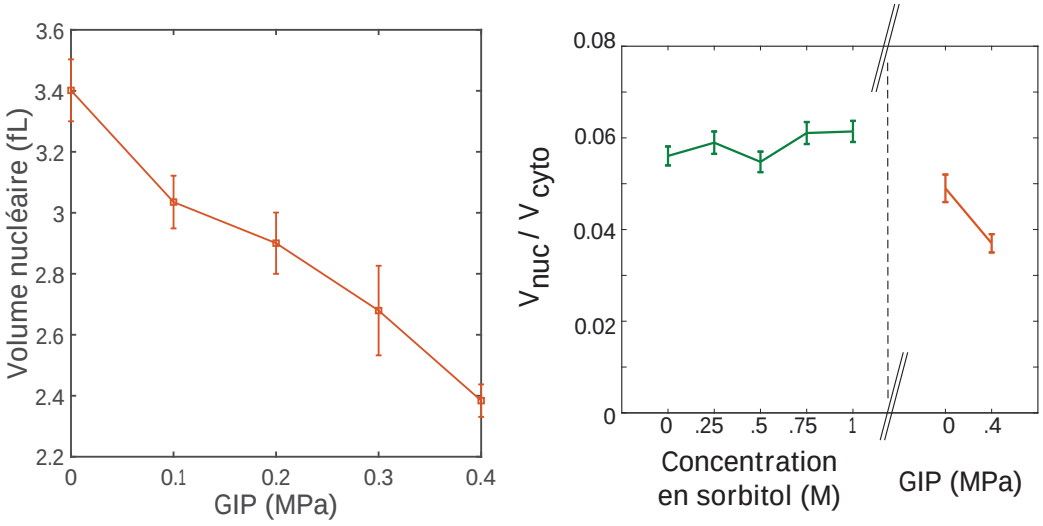


FIGURE 3.10 – Volume du cytoplasme des cellules pour différentes valeurs de GIP

Nous pouvons constater sur la figure (Fig.3.10.a) une diminution du volume nucléaire lorsque la pression induite par la croissance augmente. Les pores nucléaires laissent passer, sans régulation, des objets de taille inférieure à environ 10nm [100] : au-dessus de cette taille, des signaux de localisation sont nécessaires. Ainsi, ce ne peut pas être l'augmentation de la concentration en osmolyte qui serait responsable de la diminution en taille : une simple GFP, bien plus grande qu'une molécule comme le glycérol, passe librement par les pores nucléaires. Ceci dit, toute espèce qui ne peut pas passer par le pore nucléaire sera osmotiquement active, si bien qu'une large fraction des constituants du cytoplasmes (les macromolécules) pourraient agir osmotiquement sur le noyau. Nous pouvons appeler cette fraction de la pression osmotique la pression colloïdale. Cette pression, dans une hypothèse de croissance équilibrée, devrait donc augmenter, et conséquemment comprimer le noyau, ce que nous observons.

De manière intéressante, nous observons que la diffusion dans le noyau, mesurée en utilisant une souche exprimant des GEMs possédant des signaux de localisation nucléaire, diminue avec la pression de croissance. (Fig.3.11). Cette diminution semble similaire à celle des GEMs cytoplasmique. Ceci est également valable dans les cellules subissant un choc osmotique, bien que pour ces cellules, à la fois le volume du noyau et du cytoplasme diminuent. Ces résultats nous donnent une information cruciale sur la régulation du ratio de volume nucleo-cytoplasmique : elle semble se faire par un équilibre de la pression colloïdale, bien que la nature des espèces osmotiquement actives dans le noyau reste encore à déterminer.

Nous avons donc une explication sur l'origine de la diminution de la diffusion dans le cytoplasme lors de contraintes osmotique et mécanique que l'on peut résumer grâce au schéma suivant (Fig.3.12.a.)

Dans le cas des chocs osmotiques nous avons donc une diminution du volume cytoplasmique et nucléaire proportionnelle causée par la pression osmotique (résultat que l'on retrouve dans la

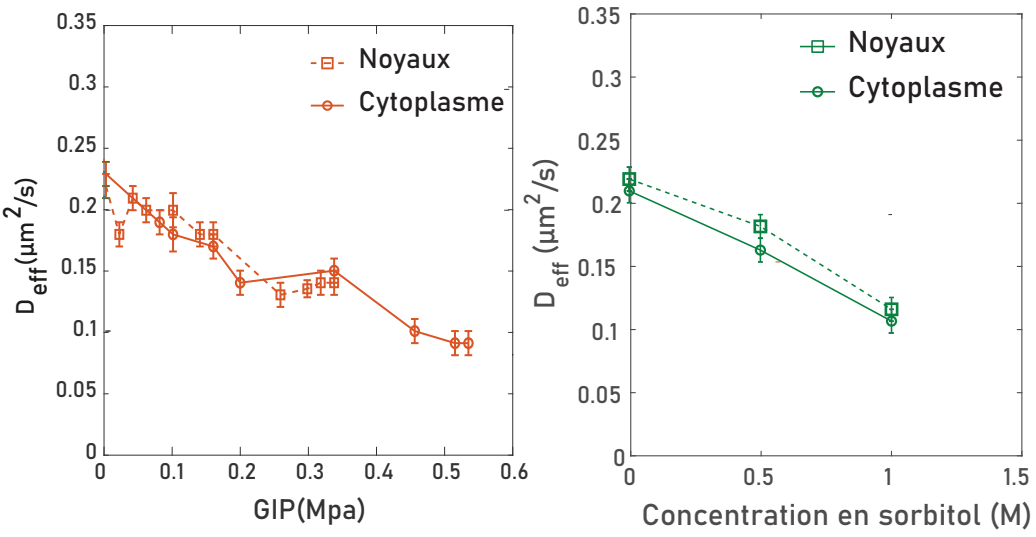


FIGURE 3.11 – Comparaison des deux courbes précédentes

littérature [91]) (Fig. 3.12.b).

Dans le cas de la pression induite par la croissance, le volume est bloqué par l'environnement des cellules, ce qui va induire une augmentation de la pression de turgescence afin d'augmenter le volume cellulaire malgré ce bloquage. Ceci entraine une augmentation de la concentration de nombreuses espèces dans la cellule, ce qui génère de la pression de croissance, augmente l'encombrement, et comprime le noyau nucléaire (Fig. 3.12.b).

Nous avons donc une diminution de la diffusion causée par l'augmentation de l'encombrement. Cette modification de l'encombrement a des origines différentes puisque dans le cas des chocs osmotiques, c'est le changement du volume qui en est responsable alors que pour la pression induite par la croissance, c'est l'augmentation des concentrations.

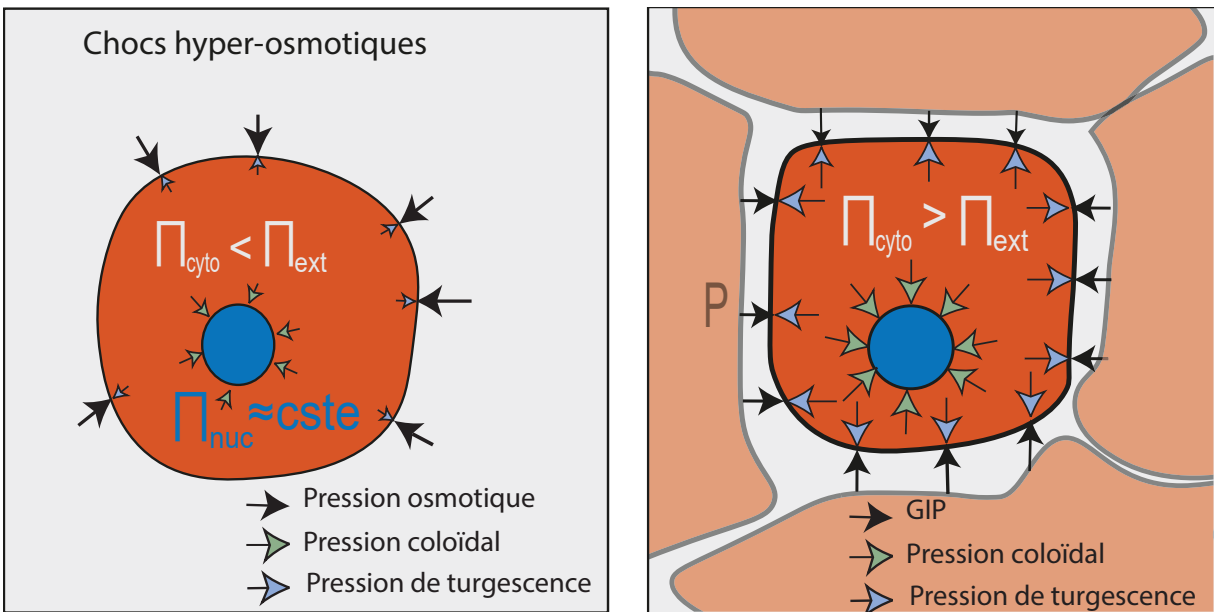


FIGURE 3.12 – Schémas représentant les pressions osmotiques internes des cellules pour : a. les chocs osmotiques b. les contraintes mécaniques.

3.3 Conclusions et perspectives

Perspective

Avant de conclure ce chapitre nous allons décrire des travaux annexes ainsi que les perspectives issues des découvertes faites durant cette thèse.

Volume des organelles sous GIP

Nous savons que la pression de croissance à des effets sur différentes parties de la cellule, il sera donc intéressant d'étudier la diffusion, et par extensions les volumes, à l'intérieur d'autres compartiments des cellules que l'on sait sensible aux chocs osmotique, tels que la vacuole [131] ou la mitochondrie [106]. Nous avons d'ailleurs commencé à étudier une sous-partie du noyau : le nucléole.

Le nucléole

Le nucléole est une sous-partie du noyau (cf. introduction) qui englobe l'ADN ribosomal, responsable de la synthèse de rARN nécessaire à la formation des ribosomes. Cet espace est supposé former une phase distincte dans le noyau[12]. Nous avons mesuré le volume du nucléole en fonction de contrainte osmotique et de pression de croissance, à l'aide d'une reconstruction 3D de la même façon que celui des cellules.

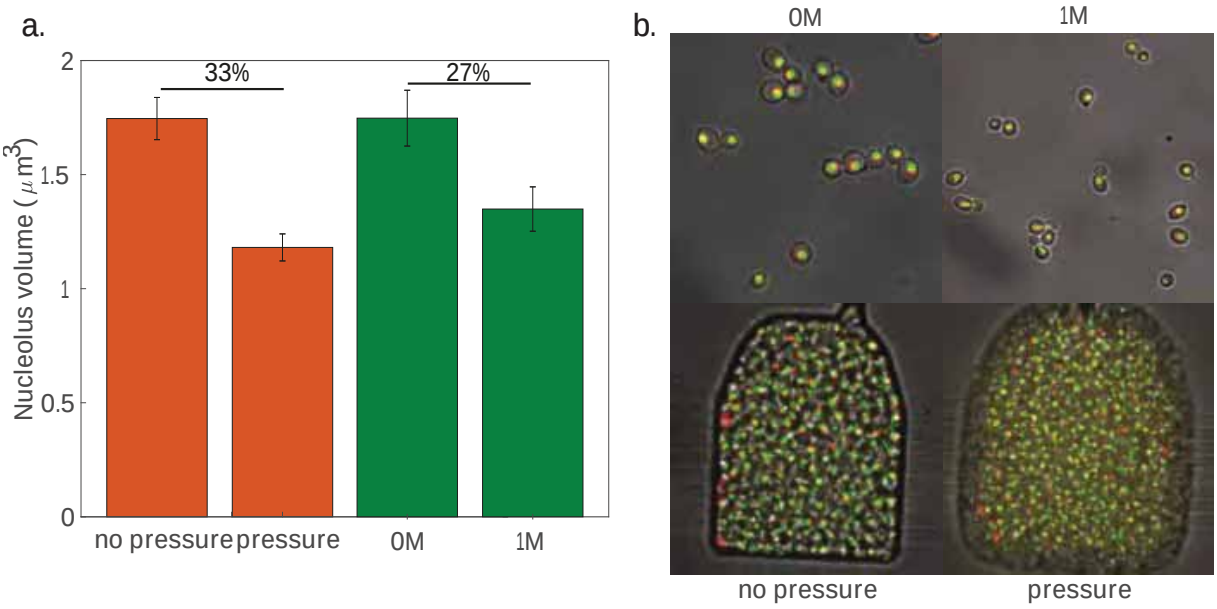


FIGURE 3.13 – Schéma des effets des pressions osmotiques et mécaniques

Nous constatons une diminution de la taille du nucléole, qui semble similaire en ordre de grandeur à l'amplitude de la diminution du volume du noyau. Bien que nous ne connaissions pas l'origine de cette diminution, elle peut avoir deux effets :

1. Cette diminution pourrait permettre à l'ADN dans le noyau de se relaxer, absorbant une partie du changement du volume nucléaire, et pourrait également permettre de ne pas augmenter trop la pression colloïdale dans ce compartiment.
2. La diminution du volume du nucléole pourrait avoir pour conséquence de diminuer la synthèse de rARN, et par suite la production de ribosome, et en conséquence limiter la synthèse de protéine, limitation ainsi l'augmentation de l'encombrement.

Quoiqu'il en soit, l'impact des contraintes sur les noyaux se propage sur le nucléole. Il sera intéressant de poursuivre cette étude en faisant des mesures dynamiques du volume du nucléole, et d'étudier l'impact de ces changements de volume.

Évolution temporelle des changements de volume et diffusion

Une autre approche particulièrement intéressante serait une étude de la diffusion pendant les différentes étapes du cycle cellulaire. Il est connu dans la littérature [31] que dans le cadre de cellules sous confinement, la phase G1 du cycle cellulaire est plus longue que dans le contrôle.

Pour cette expérience nous aurions besoin d'un marqueur se déplaçant dans différemment compartiment ou avec des variations d'intensité en fonction de la position de la cellule dans le cycle cellulaire. Cependant la taille et surtout la concentration des cellules dans nos chambres microfluidiques risque de rendre l'analyse des acquisitions complexe.

Il sera aussi pertinent de développer les études de l'impact de la relaxation mécaniques des cellules, avec un intérêt particulier aux études dynamiques. Pour cela nous avons commencé à développer de nouveaux designs basés sur le design Abate présenté précédemment (Fig.3.14). Ces nouveaux designs permettent de relaxer plusieurs chambres à la fois augmentant ainsi les statistiques mais permettant aussi de relaxer des chambres avec des valeurs de pression différentes. La différence avec les puces Abate est que nous utilisons le milieu culture pour fermer les membranes permettant ainsi d'avoir de nombreuses chambres sur la puce. Augmenter la statistique nous permettrait d'étudier à plus haut débit l'impact de la relaxation de la mécanique sur l'encombrement ou encore la croissance cellulaire.

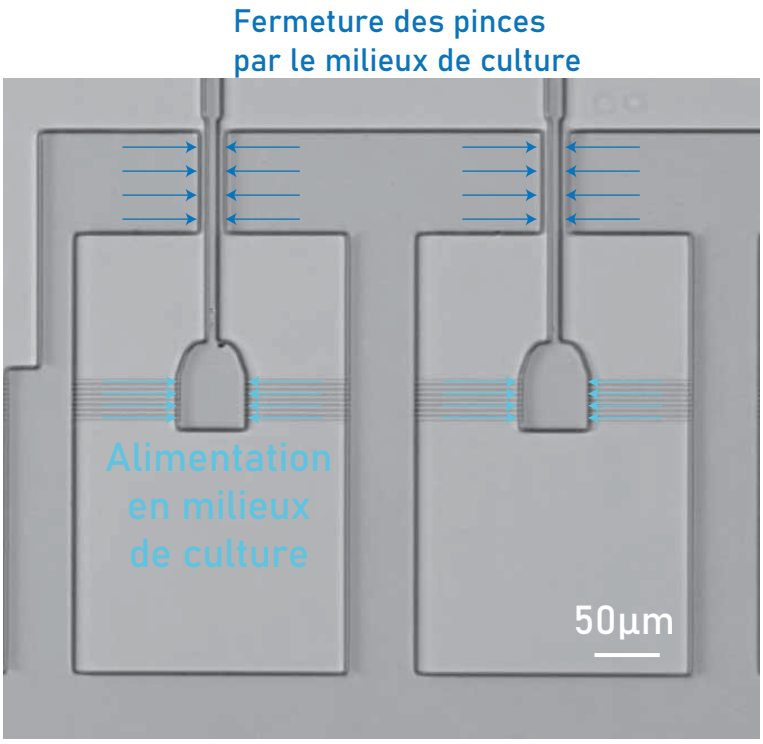


FIGURE 3.14 – Design de puce microfluidique "Médium closing"

Conclusion

Pour conclure ce chapitre, nous avons vu que lorsque que nous confinions des cellules à l'aide de dispositifs microfluidique de notre conception, celles-ci allaient déformer leur environnement (chambre et voisines) en développant une pression importante.

Cette pression apparait car la cellule produit en quantité des osmolytes, causant ainsi une forte pression de turgescence responsable de la déformation de l'environnement. Cette augmentation semble nécessaire pour croitre sous confinement : l'hypothèse la plus probable est que sous confinement, une pression de turgescence plus grande est nécessaire pour étirer le mur cellulaire et hydrolyser de nouveau composants permettant la construction du mur cellulaire.

Le confinement des cellules va donc induire une diminution de la diffusion dans les cellules par une augmentation de l'encombrement. Or il est bien connu que l'augmentation de l'encombrement dans un milieu contenant des réactifs va modifier les taux de réactions entre les espèces présentes[78]. La cellule étant un espace où de nombreuses réactions prennent place, ce changement de l'encombrement pourrait avoir des conséquences importantes.

Dans le chapitre suivant nous allons étudier l'impact que cette augmentation de l'encombrement aurait sur la physiologie cellulaire, et plus particulièrement sur la croissance des cellules.

Chapitre 4

Effet du confinement sur la physiologie cellulaire

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que les contraintes physiques issues du confinement spatial des cellules étaient reliées à une augmentation importante de l'encombrement. Quel peut-être l'effet de cet encombrement ? Nous avons déjà évoqué dans l'introduction que le confinement avait un impact sur la croissance des cellules, réduisant la prolifération cellulaire. Notre objectif dans ce chapitre est d'étudier la relation entre la diminution de la croissance et l'augmentation de l'encombrement causée par le confinement. Dans un premier temps nous allons étudier l'impact de contraintes compressives sur la croissance des cellules en définissant les taux de croissance et de division. Nous expliquerons aussi comment nous mesurons le taux de croissance dans nos systèmes microfluidique. Nous étudierons ensuite l'impact de la pression induite par la croissance sur ce taux, et chercherons à comprendre l'origine de cet impact, notamment relié à un ralentissement de la production de protéines. Nous terminerons par la présentation d'un modèle liant croissance, production protéique et encombrement.

4.1 Étude de la croissance sous contraintes mécaniques

Comme décrit dans l'introduction, la croissance des cellules diminue lorsque celles-ci prolifèrent sous confinement spatial[31, 99]. Nous allons commencer par définir les taux de division et de croissance.

4.1.1 Différence entre croissance et division

Division

Comme expliqué précédemment, lorsque certaines conditions sont remplies (comme la présence suffisante de nutriment ou sucre, ou encore la bonne réplication du matériel génétique), la cellule se divise en deux cellules. Ainsi, le taux de division, comme son nom l'indique, est défini comme la variation du nombre de cellules, N, par unité de temps. Dans une population proliférant exponentiellement, nous pouvons l'écrire $k_d = \partial_t N/N$.

Différentes méthodes ont été développées pour mesurer le taux de division, comme la mesure de la densité optique. Ces méthodes sont ceci dit peu compatibles avec nos systèmes microfluidique, qui requièrent plutôt des mesures optiques, comme le comptage direct du nombre de cellules.

Croissance

Les cellules augmentent leur volume avant de se diviser, ce qui permet à la population de maintenir une taille de cellule relativement constante : si les cellules se divisent sans avoir augmentée de volume, la taille moyenne de la cellule serait de plus en petite ; de même, si la cellule augmentait « trop » son volume avant la division, alors la taille moyenne dans la population augmenterait. Comment les cellules coordonnent croissance et division est un sujet de recherche très actif en soi, qui n'est pas le coeur de ce travail. Nous définissons le taux de croissance, k_g, comme l'augmentation irréversible du volume des cellules, v, au cours du temps. Pour un volume augmentant exponentiellement dans le temps, nous obtenons : $k_g = \partial_t v/v$. Un point important, non encore élucidé mais que nous avons discuté dans le chapitre précédent, est le lien entre augmentation de volume et augmentation de biomasse : pour maintenir une concentration relativement constante en ces divers constituants, la cellule fabrique des macromolécules qui serviront de briques élémentaires afin d'augmenter la taille et/ou la quantité de certains composants de la cellule. Cela permettra à la nouvelle cellule créée d'avoir les composants nécessaires à sa fonction, en concentration constante. La croissance cellulaire est plus complexe à mesurer que le taux de division car le volume de chaque cellule est une métrique plus difficile à obtenir que le nombre de cellule. Nous

pouvons par exemple ajouter au milieu de culture du dextran fluo et mesurer la diminution de la fluorescence par exclusion de fluorescence du corps cellulaire[31, 22], ou directement mesurer le volume des cellules à base de reconstruction 3D.

Lien entre les taux de croissance et de division

Le fait que croissance et division soient des processus différents ne les empêche pas d'être coordonnés. En effet, si les taux n'étaient pas reliés au niveau de points de contrôles ("checkpoints"), le volume cellulaire moyen changerait dans le temps. Dans le cas des levures *S. cerevisiae* il est important de noter que ces taux sont égaux([58]) : $k_g = k_d$. En effet, les cellules ont besoin d'atteindre un certain volume avant de se diviser, qui est régulé par divers procédés [103]. Comment est-ce que ces taux sont régulés sous contrainte compressive est peu connu, mais il semblerait que les deux diminuent proportionnellement sous pression[31].

4.1.2 Méthode de mesure

Dans cette étude nous allons montrer que le taux de croissance est égal au taux de division. A partir du nombre de cellules $N = \rho V$, ρ étant la densité de cellules dans la chambre et V le volume de la chambre, nous pouvons écrire le taux de division : $k_d = \partial_t \rho / \rho + \partial_t V / V$. Nous mesurons en pratique le taux de division des cellules de la manière suivante, à partir de ces deux contributions :

1. La variation de la densité de cellules ρ dans la chambre.

2. La variation du volume V de la chambre à partir de sa déformation en fonction de la pression.

Pour mesurer la densité en cellule dans la chambre, nous détectons le nombre de cellules à l'aide d'un marquage de leurs histones avec une protéine fluorescente *mCherry* (fusion *HT2B-mCherry*). Ceci nous permet de suivre exactement le nombre de cellules dans les chambres (en rouge sur la Fig.4.1). Afin de ne pas prendre en compte les cellules potentiellement mortes (lyse spontanée), qui deviennent auto-fluorescentes dans des longueurs d'ondes similaires à notre marquage, nous acquerrons aussi des images en DAPI qui vont nous permettre de compter ces cellules mortes (en jaune sur la Fig.4.1) et ainsi de les retirer du nombre de cellules acquis en mCherry.

Pour mesurer la variation du volume des chambres, nous allons utiliser la déformation du PDMS. Son acquisition est réalisée en lumière blanche comme pour la mesure de la pression décrite dans le chapitre précédent (en blanc sur la Fig.4.1). Le PDMS ayant des propriétés élastiques simples pour les petites déformations, cette mesure n'est pas la compliquée à réaliser.

Rappelons que nous avons montré dans le chapitre II (Figure 3.7) que le volume cellulaire restait quasiment constant sous pression. En notant v_c le volume moyen cellulaire, nous avons que le volume total en cellules $V_c = v_c N$. Puisque v_c est une constante, cela entraine que, pour la population de cellules, $k_g = k_d$: les taux de division et de croissance semblent rester coordonnés sous pression. Par la suite, **nous parlerons de taux de croissance**, sachant que ces deux taux sont similaires.

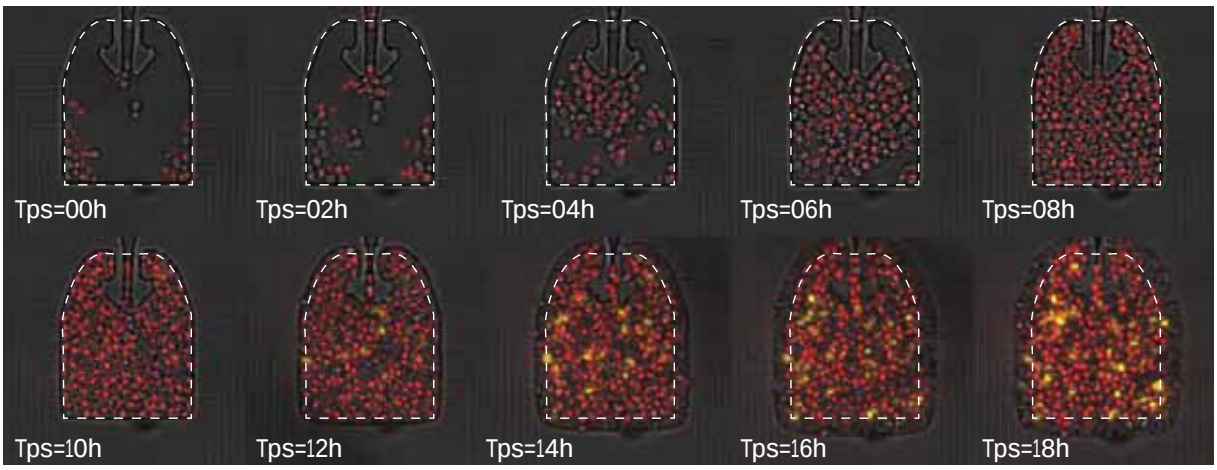


FIGURE 4.1 – Image de l'acquisition de l'expérience de croissance en fonction de la pression avec en rouge le noyau des cellules, en blanc la taille initiale de la chambre permettant de détecter la déformation de la chambre, et en jaune les cellules mortes détectées par auto-fluorescence dans le canal du DAPI.

Une fois les acquisitions faites, nous utilisons des programmes Matlab que j'ai développés durant ma thèse pour calculer le taux de division en sommant les variations de densité et de volume de la chambre. Nous moyennons ensuite les courbes obtenues sur plusieurs expériences afin de tracer la figure suivante.

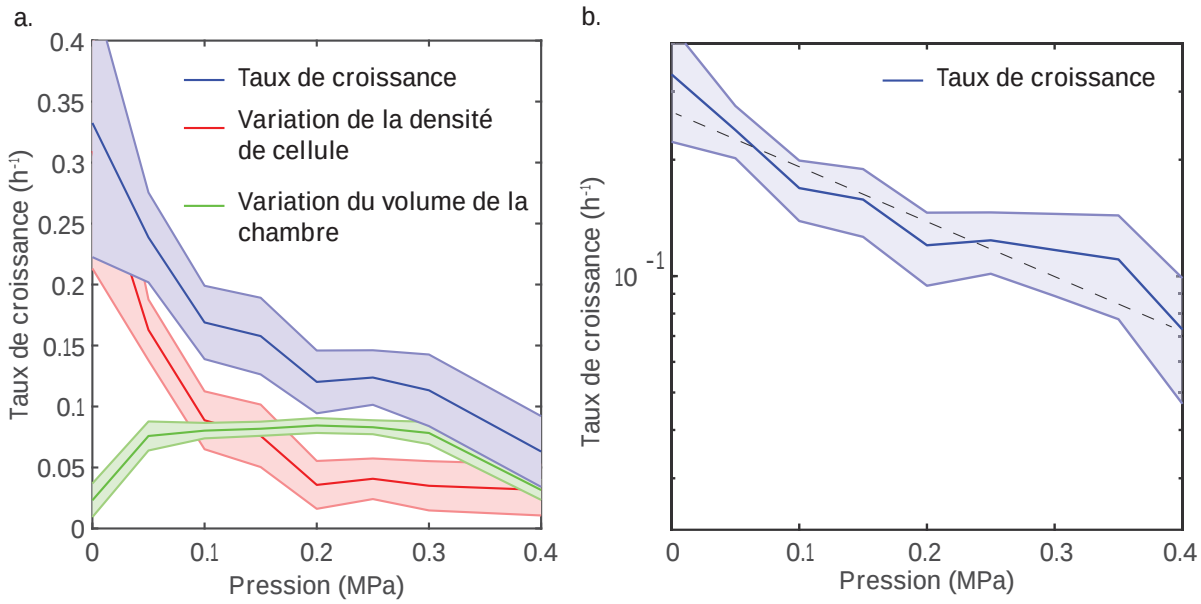


FIGURE 4.2 – Taux de croissance en fonction de la pression induite par la croissance avec en bleu le taux de croissance, en rouge la composante venant de la variation de la densité de cellule, et en vert la composante venant de la variation du volume de de la chambre.

Nous pouvons constater plusieurs chose sur cette figure 4.2.a.

Premièrement, si l'on regarde le comportement des deux contributions, nous pouvons constater que pour les petites valeurs de pression, c'est la contribution de la densité qui impose la dynamique, alors que pour les plus grandes valeurs, c'est la contribution du volume de la chambre : la densité reste constante dans la chambre. Ceci s'explique par le fait que pour les petites pressions, la déformation de la chambre augmente doucement car les cellules peuvent toujours se réorganiser spatialement, mais dès qu'il n'y a plus de place, elles vont plus fortement pousser les unes sur

les autres et vont déformer le PDMS.

Deuxièmement, nous pouvons voir que le taux de croissance à une allure exponentielle (Fig.4.2.b), comme rapporté précédemment[31].

Pour terminer, nous retrouvons bien le résultat de la littérature, c'est-à-dire, une croissance qui va ralentir avec l'augmentation de la pression induite par la croissance.

Nous allons étudier dans la prochaine partie deux origines possible de ce phénomène : une voie protéique qui régulerait la croissance sous pression, et un impact direct de l'encombrement sur la production de protéines.

4.2 Étude de l'origine de la diminution de la croissance des cellules confinées

Nous venons de voir que lorsque les cellules sont confinées, elles ont une croissance ralentie. Nous allons dans cette partie étudier l'origine potentielle de ce ralentissement.

4.2.1 Une voie de signalisation qui détecte/contrôle la croissance sous confinement.

La première piste que nous avons étudiée est l'existence de voies de signalisation qui détecteraient ces changements dans l'environnement mécanique de la cellule, et seraient responsables de la diminution de la croissance.

Réseau de signalisation SCWISh

Nous allons nous concentrer sur deux voies de signalisation, la voie d'intégrité du mur cellulaire, CWI, et une voie récemment découverte appelée SMuSh [32], reliée en partie à la réponse osmotique de la cellule. L'ensemble de ces deux voies est nécessaire à la survie cellulaire sous pression, et forment ensemble le réseau de signalisation SCWISh[32]. La voie de signalisation SMuSh déclenche en particulier la kinase Ste11 qui est en amont de nombreux facteurs de transcription dont Hog1, et semble bloquer les cellules au niveau de la transition G1/S. La voie CWI, quant à elle, est responsable de l'intégrité du mur de la cellule, particulièrement stressé durant la croissance sous pression.

Ces deux voies protéiques sont composées de plusieurs protéines (Fig.4.3.a) et sont indispensables à la survie des cellules lorsque qu'elles sont soumisses à une pression mécanique(Fig.4.3.b). En effet, une délétion d'une des kinases essentielles à ces voies, Ste11 pour SMuSh et Slt2 pour CWI, diminue énormément la survie sous pression. Le double KO est viable, mais est incapable de survivre sous pression (100% de mort cellulaire sous confinement).

Nous allons nous concentrer sur ces deux protéines, Slt2 et Ste11, et mesurer le taux de division sous pression. Cela afin de vérifier leur implication dans la diminution de la croissance sous pression.

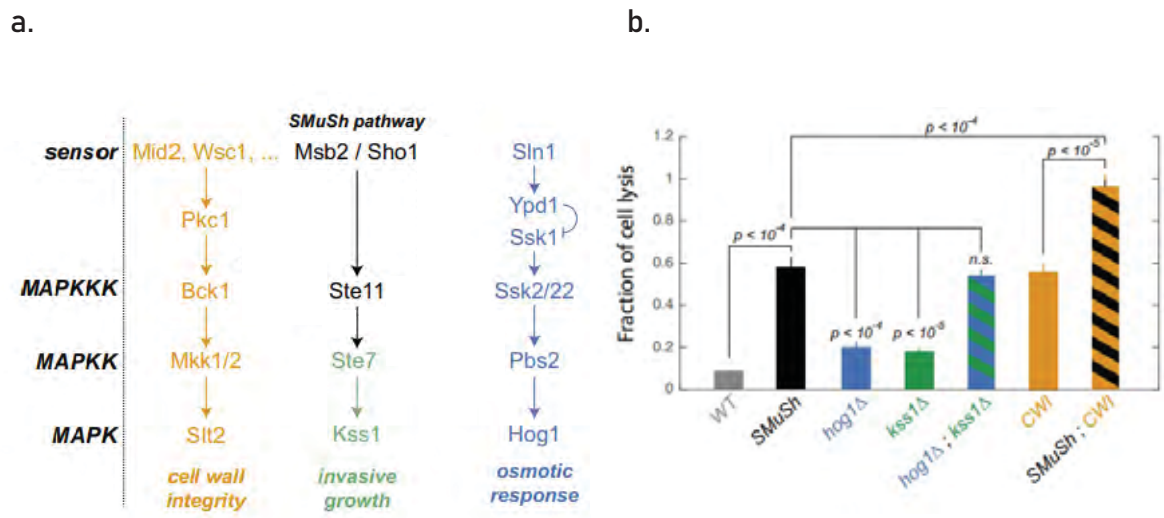


FIGURE 4.3 – a. Présentation des voies de signalisation CWI et SMuSh b. Fraction de cellules mortes lors d'une croissance sous confinement (données issues de l'article de "Delarue et al."[32])

Présentation de Slt2 et de Ste11

Slt2 est une sérine MAP kinase, impliquée dans la survie cellulaire et qui fait partie de la voie protéique CWI. Elle est présente dans de nombreux processus biologique tels que l'intégrité du mur cellulaire [68], mais aussi la mitophagie [67] ou la régulation de la taille de la cellule [64]. Ste11, quant à elle, est une MAPKKK centrale à plusieurs procédés comme la réponse osmotique[88], la croissance pseudo-hyphale, ou encore le "mating", et est également impliquée dans la prolifération cellulaire[96]. Nous avons étudié des cellules dans lesquelles les gènes codant pour ces protéines ont été délétés afin de rendre ces voies inactives, à la fois pour retrouver l'impact de la pression sur les cellules mais aussi pour étudier les taux de croissance en fonction de pression. Et pour cela nous avons aussi marqué les histones de ces cellules avec une protéines fluorescentes comme précédemment, afin de suivre le taux de division en fonction de la pression. Ici, nous parlerons de taux de division et non plus généralement de croissance, car nous n'avons pu mener une étude systématique du volume cellulaire, à cause des nombreux débris qui limitent ces mesures. A première vue, celui-ci semble ne pas décroitre, mais une mesure plus rigoureuse est nécessaire pour le confirmer.

Résultat

Nous pouvons premièrement observer que, pour les souches mutantes, il y a beaucoup plus de morts après 15h de croissance (Fig. 4.4.a).

Pour ce qui est de la dynamique de la prolifération, nous remarquons que comme précédemment, celle-ci diminue en fonction de la pression. Cependant nous pouvons noter que le bruit dans ces expériences est assez important, de par la quantité non-négligeable de débris cellulaires, qui même s'ils sont pris en compte, rendent les mesures complexes.

Bien que nous mesurions ici le taux de division, il semble diminuer de manière assez similaire à celui de la souche contrôle. Ceci suggère donc que l'activité de ces protéines ne change pas la dynamique de la croissance sous pression. Cela ne nous permet ceci dit pas d'exclure l'impact d'une autre voie de signalisation sur la diminution de la croissance. Mais ces données suggèrent que le réseau de signalisation SCWISh ne semble pas être responsable de la diminution de la division, malgré le fait qu'il soit impliqué dans la survie sous contraintes mécanique. Ce qui nous fait pen-

ser que la diminution de la croissance ne dépend pas d'une voie de signalisation biologique mais d'un phénomène biophysique.

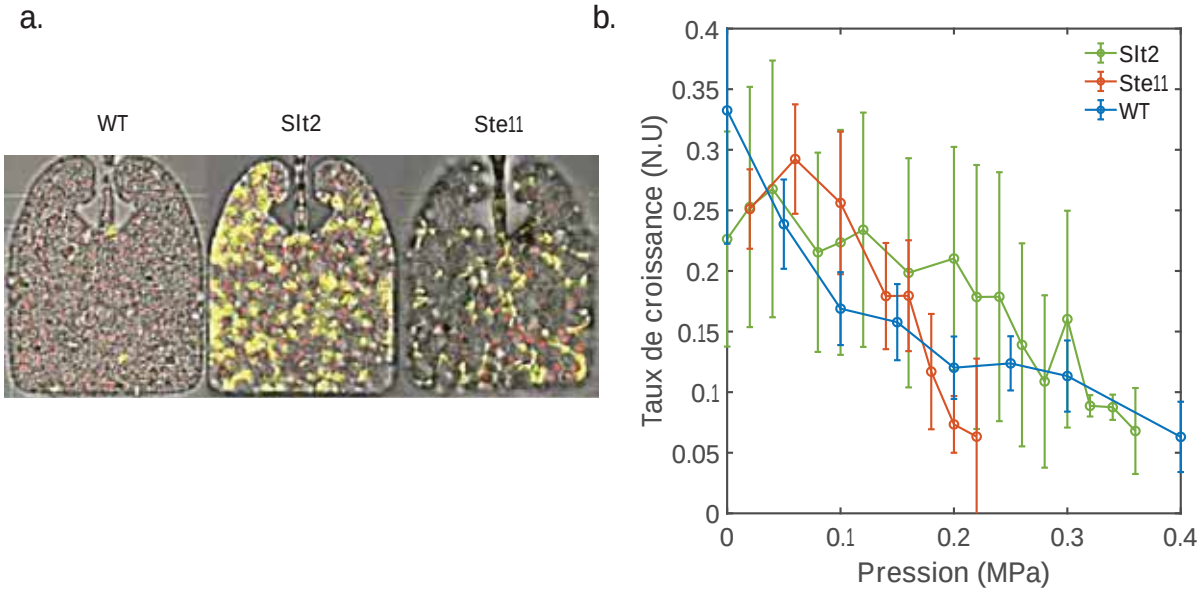


FIGURE 4.4 – a. Chambre microfluidique remplie de cellules après 15h de croissance sous confinement. b. Taux de division en fonction de la pression induite par la croissance pour les cellules WT, Slt2Δ et Ste11Δ

Nous allons maintenant étudier notre deuxième hypothèse sur l'origine de la diminution de la croissance.

4.2.2 Une diminution de la production protéique

S'il n'y a pas de voie de signalisation diminuant spécifiquement la croissance cellulaire sous pression, nous pouvons supposer que l'augmentation de l'encombrement peut impacter de nombreux processus dans la cellule, à commencer par la production de protéines.

En effet comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, la pression induite par la croissance entraîne une augmentation de l'encombrement dans les cellules. Or, il a été montré que l'augmentation de l'encombrement modifiait le taux de réactions biochimique [77, 79]. Nous allons voir dans cette partie comment l'augmentation de l'encombrement causé par la pression induite par la croissance peut diminuer le taux de production d'un rapporteur protéique.

Présentation du rapporteur $P_{ADH2} - mCherry$

$P_{ADH2} - mCherry$ est un rapporteur fluorescent du promoteur P_{ADH2}, promoteur de la protéine Adh2 induite lorsque la cellule est affamée en source de carbone comme le glucose. Concrètement, cette protéine fait partie d'une voie de signalisation qui permet de passer d'un métabolisme basé sur le glucose à un métabolisme basé sur l'éthanol[48]. Nous avons choisi ce rapporteur pour deux raisons principales. D'abord, parce qu'elle va être induite uniquement lorsque que nous allons changer le milieu de culture, et n'a jamais été rapportée comme étant mécano-sensible. Ensuite, parce que le retrait de glucose diminue fortement la croissance cellulaire, inhibant ainsi la génération de pression de croissance, et nous permettant de travailler à pression de croissance-constante.

Ce système nous permet ainsi de laisser les cellules se développer dans nos chambres microfluidique avant de changer de milieu pour un milieu appauvri dans lequel nous avons rem-

placé le glucose par du sorbitol pour maintenir l'osmolarité du milieu, sans déclencher cette protéine au préalable. Comme les cellules affamées arrêtent leur croissance[21], la pression induite par celle-ci n'augmentera plus. Nous avons fusionné le promoteur P_{ADH2} avec un fluorophore *mCherry*, et allons observer son expression pour différentes valeurs de pression induite par la croissance(Fig.4.5.a).

Nous allons mesurer la fluorescence d'une centaine de cellules et ajuster chacune des courbes obtenues avec une fonction quadratique permettant d'extraire un taux de production effectif des protéines (voir SI de l'article en Annexe 1). Nous moyennons ensuite ces courbes pour obtenir une valeur du taux de production de protéines pour différentes valeurs de pression (Fig.4.5.b).

La loi quadratique utilisée $I = k_{exp}(t - t0)^2$, nous donne accès à la fois à k_{exp}, le taux d'expression de la protéine fluorescente, qui est un taux effectif prenant en compte transcription, trafficking, dégradation ou encore traduction. Le paramètre $t0$ représente quant à lui le délai d'induction de la protéine. Nous pouvons constater sur la figure4.5.b que l'ajustement quadratique modélise bien nos courbes ($R^2 > 0.95$).

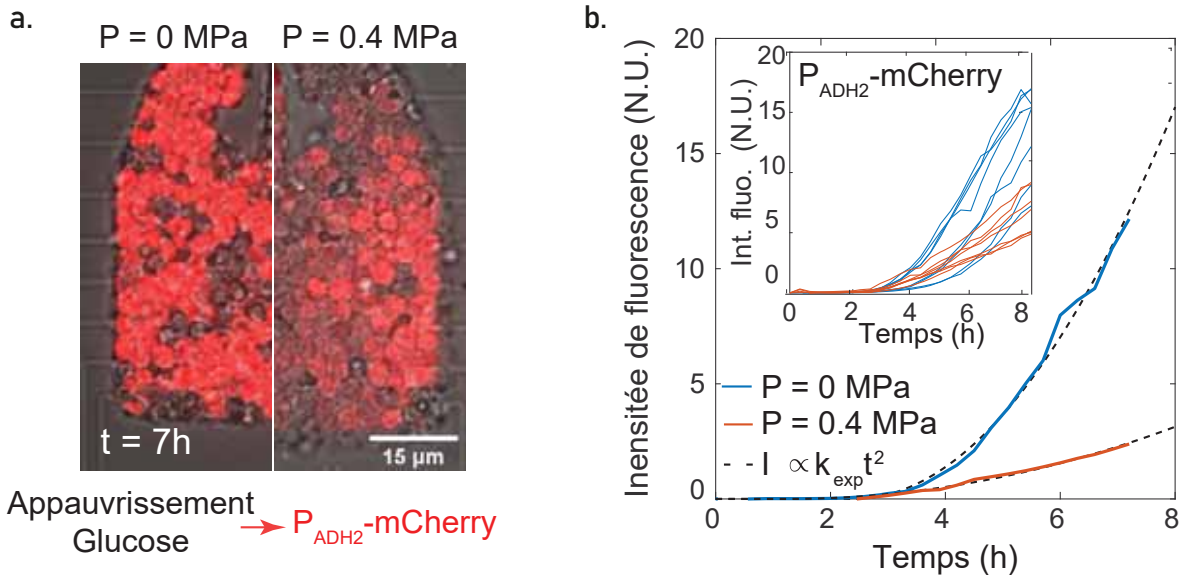


FIGURE 4.5 – a. Comparaison de la variation de fluorescence de la construction $P_{ADH2} - mCherry$ dans deux chambres : celle de gauche sans pression, et celle droite avec une pression de 0.4 MPa. b. Intensité de fluorescence à l'intérieur des cellules, pour des cellules sous pression (en orange) et sans pression (en bleu). Chaque courbe est ajustée par la fonction quadratique $I = k_{exp}(t - t0)^2$. L'encart représente une dizaine de cellules pour chacune des conditions, montrant la dispersion et la reproductibilité de l'expérience.

Nous pouvons déjà remarquer qu'il y a une différence dans les cas avec et sans pression. En effet, lorsque qu'il n'y a pas de pression, nous observons que les cellules ont produit plus de protéines que la condition comprimée (Fig.4.5.a), et ont donc une fluorescence plus importante. Ceci est confirmé par la comparaison des courbes de fluorescence. Nous voyons en effet que la courbe de fluorescente est beaucoup plus rapide dans le cas des cellules sans pression que celles étant soumissent à une pression de 0.4 MPa.

4.2.3 Impact des contraintes compressives sur la production protéique

Observons dans un premier temps les effets de la pression induite par la croissance sur le taux d'expression de notre construction, ainsi que sur le délai d'induction de la protéine.

Impact de la pression induite par la croissance sur la production de protéines

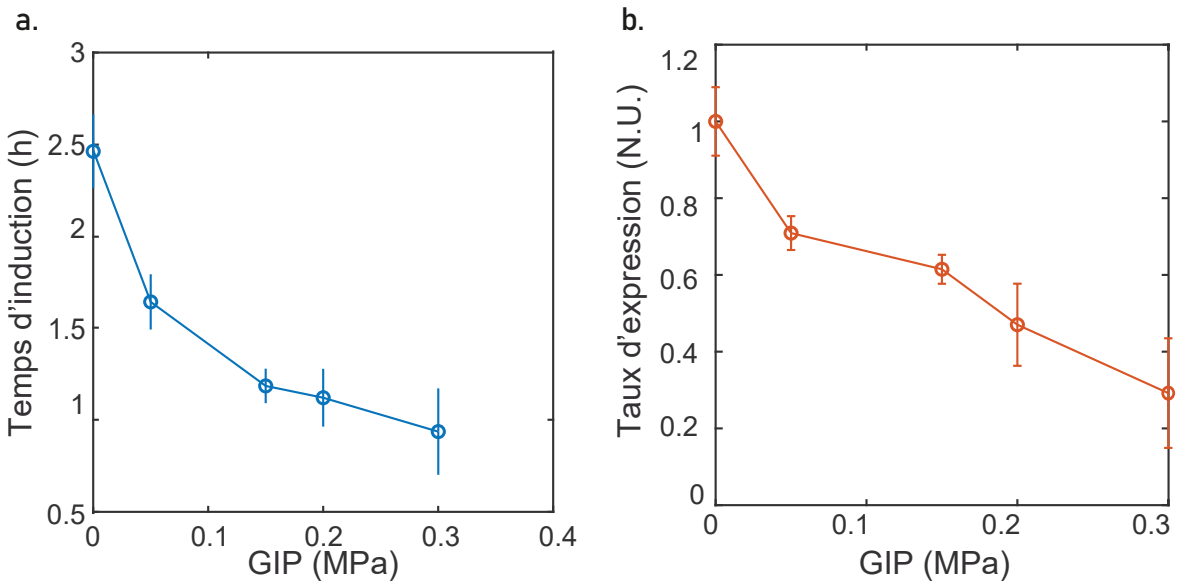


FIGURE 4.6 – a. Temps d'induction de la protéine mCherry de la construction $P_{ADH2} - mCherry$ en fonction de la pression de croissance. b. Taux d'expression de la protéine mCherry en fonction de la pression de croissance.

Nous remarquons que les deux paramètres diminuent avec l'augmentation de la pression expérimentée par les cellules.

Nous pouvons constater premièrement que le délai d'induction est de plus en plus court lorsque la pression augmente. Ceci peut sembler contradictoire avec notre hypothèse de diminution de la vitesse de réaction en fonction de la pression de croissance.

Cependant nous pouvons potentiellement l'expliquer par le fait qu'il a été démontré précédemment que lorsque les cellules sont confinées elles ont tendances à s'accumuler dans la phase G1 du cycle cellulaire ([31]. Or il a été aussi montré que les cellules sont plus sensibles à une diminution de la concentration de glucose lorsque qu'elles sont en G1 ([21]). Ceci expliquerait donc pourquoi le délai d'induction de la protéine est plus court lorsque les cellules sont sous pression.

Regardons maintenant l'évolution du taux d'expression en fonction de la pression de croissance. Nous pouvons constater une diminution de ce taux en fonction de l'augmentation de la pression générée par les cellules. Ceci nous indique donc que dans le cas de cellules soumissent à une pression mécanique, la production protéique va être ralentie.

Pour confirmer ce résultat et vérifier que cet impact n'est pas spécifique au rapporteur testé, nous avons mesuré le taux de production d'une protéine fluorescente placée sous un promoteur constitutivement actif, le promoteur P_{HIS3}. La mesure est dans ce cas un peu différente de la précédente : au lieu d'induire l'expression d'un rapporteur inductible, nous mesurons en direct l'évolution de la fluorescence. Pour ce promoteur constitutif l'expression n'est pas régulée, de sorte que nous émettons l'hypothèse que la variation de la quantité de fluorescence est proportionnelle au taux de création net de la protéine (production moins dégradation) retranché du taux de croissance. Lorsque la croissance est équilibrée, le taux de création net est équilibré par le taux de croissance de la cellule, et la concentration (donc l'intensité de fluorescence) reste constante.

Nous mesurons donc le taux de création de ce fluorophore par la variation d'intensité de fluorescence dans le temps, corrigée par le taux de croissance. Nous pouvons constater sur la Fig.4.7 que nous retrouvons une diminution similaire du taux de production, et donc que cet effet n'est pas spécifique de notre rapporteur.

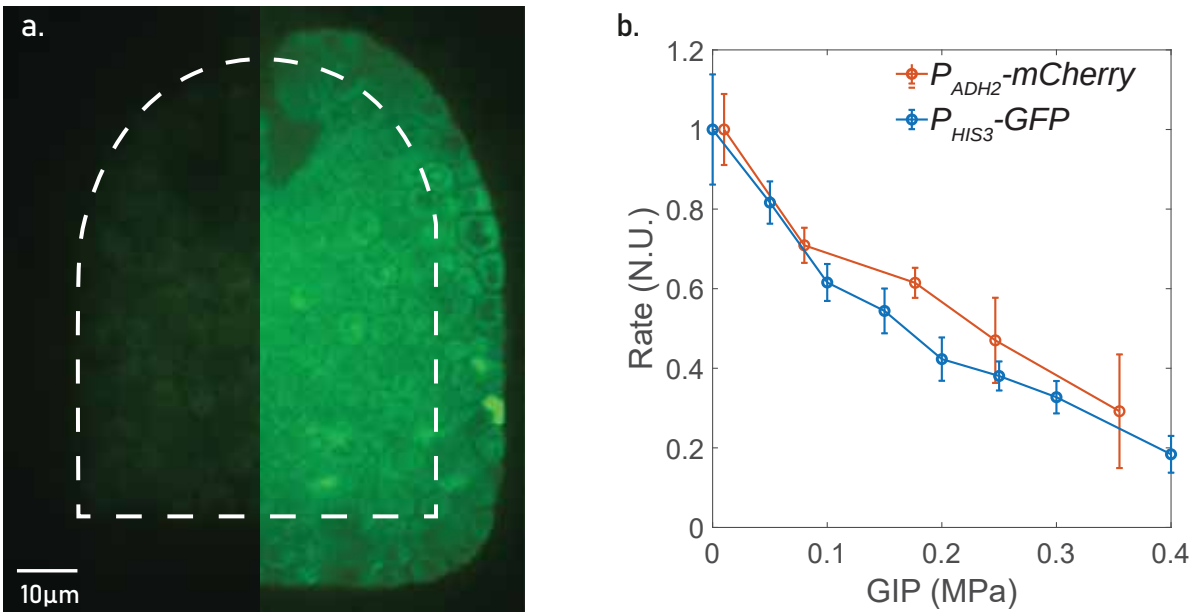


FIGURE 4.7 – a. Fluorescence de la construction $P_{HIS3} - GFP$ dans une chambre microfluidique, à gauche sans pression, et à droite avec 0.4 MPa de pression. Nous remarquons que l'intensité de fluorescence est plus importante, signe encore d'une accumulation de protéine. Attention, ce qui compte n'est pas l'intensité en tant que telle, mais sa variation qui, elle, ralentit. b. Taux d'expression des construction $P_{ADH2} - mCherry$ et $P_{HIS3} - GFP$ en fonction de la pression de croissance.

Lien entre production protéique et encombrement

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la pression induite par la croissance était reliée à une augmentation de l'encombrement dans la cellule. Nous allons ici étudier le lien entre encombrement dans la cellule et impact sur la production des protéines. Pour étudier l'encombrement, comme précédemment, nous allons regarder l'impact des modifications de l'encombrement dû au confinement mais aussi celles causées par des chocs osmotiques. Pour cela nous allons mesurer l'évolution de la fluorescence émise par la construction $P_{ADH2} - mCherry$ (Fig.4.8.a), dans une souche pour laquelle le gène HOG1 a été délété. En effet, cette délétion rend les cellules incapables de s'adapter aux chocs osmotiques ([54]) que nous allons leurs imposer. Cette construction nous permet donc d'étudier sur les temps longs l'impact d'une augmentation pure de l'encombrement, et de la comparer aux compressions mécaniques générées par la croissance.

Nous pouvons premièrement remarquer, de la même façon que lorsque les cellules sont confinées, que les cellules sous choc osmotique présentent une production protéique ralentie (Fig.4.8.b). Or, comme nous l'avons vu précédemment, les chocs osmotiques eux-aussi entraînent une augmentation de l'encombrement dans la cellule. Ainsi, en mesurant le taux d'expression de la protéine en fonction du coefficient de diffusion de GEMs de 40nm de diamètre dans le cytoplasme, nous pouvons effectivement constater que la production protéique va diminuer en même temps que la diffusion dans la cellule. Cette diminution suit une loi de puissance, qui serait attendue si la production de protéine était limitée par la diffusion, l'exposant donnant la taille caractéristique de l'objet qui serait limitant dans la cellule (plus de détails sur ce modèle sont donnés dans l'article en annexe 1 [3]). ‘

Nous remarquons que les données issues de la pression de croissance et des chocs osmotiques suivent exactement la même tendance. Cette similitude a une importance capitale : ces deux contraintes qui n'ont pas la même origine ont les mêmes conséquences sur la cellule, à savoir une augmentation de l'encombrement et une diminution de la synthèse des protéines. Tracés ensemble, elles indiquent fortement que l'origine de la diminution de la production de protéines est similaire. La production protéique est donc compatible avec un modèle dans lequel l'augmen-

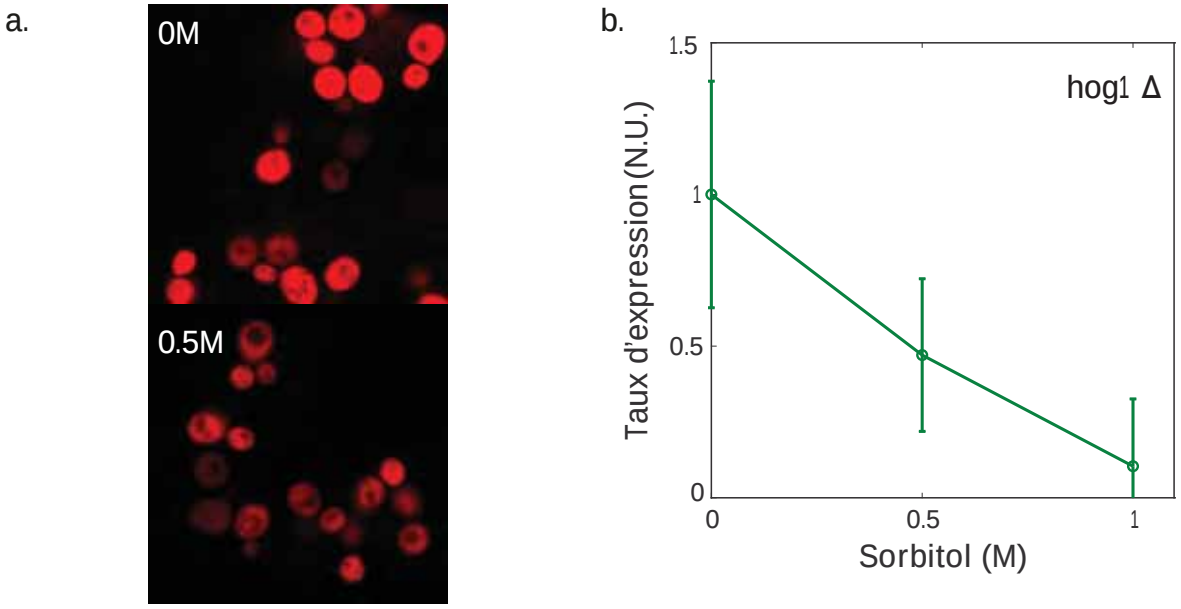


FIGURE 4.8 – a. Cellules avec la construction $P_{ADH2} - mcherry$ après 6 heure de culture dans le milieu appauvri en glucose présenté précédemment (en haut) et le même milieu dans lequel a été rajouté 0.5 M de sorbitol (en bas). b. Taux d'expression de la constructions $P_{ADH2} - mcherry$ en fonction de la concentration en sorbitol dans le milieu de culture.

tation de l'encombrement limite les réactions par la diffusion. Or, nous avons constaté précédemment que la croissance des cellules dépendait de la pression induite par la croissance. Ceci nous amène à étudier le lien entre taux de croissance et taux de production protéiques.

Lien entre production protéique et croissance

Nous avons tracé le taux de croissance en fonction du taux de production protéique pour des cellules subissant soit un choc osmotique, soit une contrainte mécanique. Nous pouvons constater premièrement que, comme précédemment, l'effet des deux types de contraintes est similaire. Ceci nous confirme que l'effet premier sur la croissance semble lié à une diminution de la production protéique, elle-même liée à l'augmentation de l'encombrement.

Nous remarquons aussi une courbe qui semble linéaire entre les deux phénomènes de croissance et de production protéique. Ceci semble indiquer que la croissance serait principalement limitée par la production protéique. Ceci fait sens, sachant que la cellule a besoin de briques élémentaires pour croître et que, si la production de ces briques élémentaires est ralentie, la croissance le sera inévitablement.

Nous allons décrire maintenant un modèle théorique qui permet de lier production protéique, croissance et encombrement, et qui explique grandement nos résultats expérimentaux.

4.3 Modèle de l'impact de la modulation de l'encombrement cellulaire

Dans le chapitre précédent nous avons vu que l'encombrement augmente dans les cellules sous confinement, car celles-ci ont besoin de créer des osmolytes afin de développer une pression de turgescence assez grande pour déformer leurs murs, hydrolyser du nouveau matériel, et ainsi grossir. Cependant, comme les cellules sont soumissent à une pression mécanique exercée par leurs voisines, elles vont devoir développer une pression de plus en plus grande pour augmenter leur volume et pour cela créer de plus en plus d'osmolytes. Nous avions également montré que

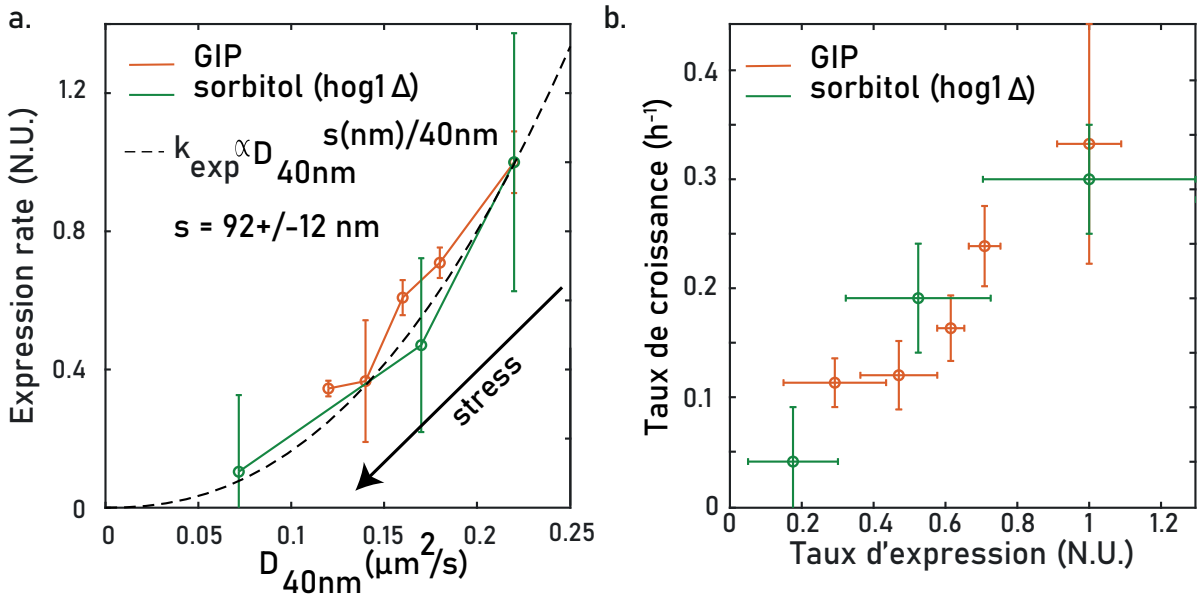


FIGURE 4.9 – a. Taux d'expression de la construction $P_{ADH2} - mCherry$ en fonction de la diffusion des GEMs cytoplasmique de 40nm lors des chocs osmotiques (en vert) et lors du confinement (en orange). b. Taux de croissance en fonction du taux d'expression de la protéine $P_{ADH2} - mCherry$ pour des cellules confinées (points orange) ou pour des cellules subissant un choc osmotique (point vert)

l'augmentation d'osmolyte se fait de pair avec une augmentation de la concentration en macromolécules, augmentant ainsi l'encombrement macromoléculaire.

Nous venons de voir dans ce chapitre que lorsque que les cellules sont sous confinement, l'encombrement semble physiquement rétro-agir sur l'encombrement lui-même, les cellules produisant de plus en plus lentement des macromolécules lors qu'elles sont encombrées et donc ralentissant l'augmentation de l'encombrement. Donc si nous posons, comme précédemment, l'hypothèse que la fabrication des osmolytes est proportionnelle à celle des macromolécules, la production des osmolytes va aussi diminuer avec le confinement.

4.3.1 Principe du modèle développé

La croissance des cellules dépend de la production de macromolécules nécessaire à leur croissance, mais va aussi être liée à la production en osmolyte. Il est d'ailleurs important de noter qu'une partie des macromolécules produites sert à en produire d'autre (exemple : les ribosomes) et donc a un effet "catalyseur".

Cet effet explique par ailleurs la croissance exponentielle des cellules[59]. Cependant cette production de macromolécules entraîne une augmentation de l'encombrement qui a un effet inhibiteur sur la production, en limitant par la diffusion les réactions. Dans le cas où il n'y pas de contrainte, la production proportionnelle d'osmolytes entraine la croissance de la cellule à un rythme qui maintient l'encombrement constant.

Dans le cas où les cellules sont physiquement contraintes par leur environnement, cette croissance va être limitée par le fait que les cellules vont avoir besoin de développer plus de forces pour déplacer leur environnement, et donc plus d'osmolytes. Une seconde hypothèse centrale est que les cellules ont toujours besoin de déformer avec la même intensité leur mur pour croitre ; ainsi, plus elles sont confinées, et plus la force développée doit être grande. La croissance sera ralentie à la fois par les limites physiques de l'environnement et par un ralentissement de la production des espèces nécessaires à sa croissance.

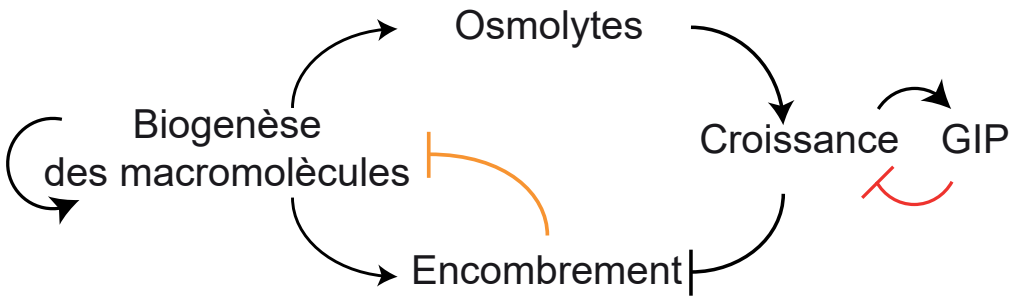


FIGURE 4.10 – Schéma récapitulatif du modèle

4.3.2 Résultats de ce modèle

L'ensemble de ces hypothèses (déformation constante et proportionnalité entre création d'osmolyte et de macromolécules) est suffisante pour expliquer nos données. La création de ce modèle et sa paramétrisation sont issues de l'article en annexe 1 [3] écrit pendant ces travaux de thèse. Nous allons voir dans cette partie comment, une fois paramètrisé à l'aide uniquement de valeurs mesurées expérimentalement, ce modèle nous permet de prédire des résultats expérimentaux avec une bonne précision, et d'étudier l'effet relatif de l'encombrement.

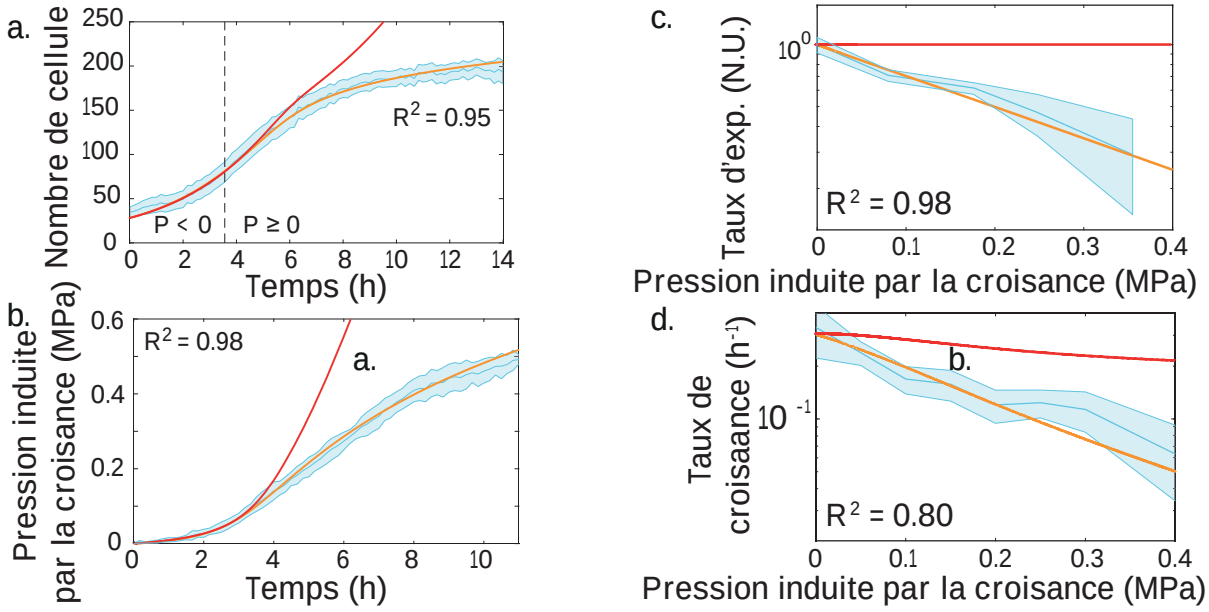


FIGURE 4.11 – Comparaison de données expérimentales en bleue, et des prédictions du modèles en orange (en rouge les prédiction du modèle sans l'impact de l'encombrement). a. Le nombre de cellule en fonction du temps. b. La pression induite par la croissance en fonction du temps. c. Le taux d'expression du promoteur P_{ADH2} en fonction de la pression induite par la croissance d. Le taux de croissance de la pression induite par la croissance

Nous pouvons constater (en orange sur les courbes) qu'effectivement, pour les différentes paramètres observés (variation du nombre de cellules, pression induite par la croissance, taux d'expression et taux de croissance) que le modèle est capable de **prédire** les résultats expérimentaux. Cette excellente prédiction confirme nos hypothèses simples. Elles montrent également que l'effet de l'encombrement sur la croissance cellule est très important.

En effet, nous avons étudié l'effet de relaxer cette contrainte du modèle (absence de rétroaction de l'encombrement sur la création de protéines) sur le taux de croissance (courbe en rouge).

Nous pouvons constater que dans ce cas-là, notre modèle n'est pas capable de prédire correctement les résultats expérimentaux, et qu'une large partie de la diminution du taux de croissance est en fait dû à une diminution de la création du taux de protéines. Ceci valide posteriori la quasi proportionnalité entre ces deux taux.

4.4 Conclusions et perspectives

4.4.1 Perspective

Crible de l'ensemble des gènes de *S. cerevisiae*

Dans ce chapitre nous avons constaté que l'impact du confinement sur la croissance cellulaire ne semblait pas être lié à des voies de signalisation pourtant connues comme impliquées dans la survie des cellules sous pression mécanique (réseaux SCWISh). Cependant nous ne pouvons pas pour autant conclure que le phénomène de diminution de la croissance sous confinement n'implique aucune voie de signalisation, qui pourraient par exemple être reliées à la régulation de l'encombrement sous pression. Afin de vérifier ceci, nous allons étudier l'impact de la délétion d'autre gènes, en commençant par des voies connues pour réguler l'encombrement ou y répondre, comme l'autophagie, et en continuant ainsi sur une grande partie des gènes de la levure. L'étude de ce crible sur des centaines de souches représente un travail important et est littéralement impossible à réaliser avec nos dispositifs et nos méthodes d'analyse actuels. Il sera donc nécessaire de faire trois améliorations :

1. Développer et fabriquer des puces permettant de suivre au minimum et en simultané une dizaine de souches différentes.
2. Développer une méthode d'analyse qui permettrait d'obtenir automatiquement la courbe de taux de croissance en fonction de la pression
3. Une organisation des gènes possiblement impliqués dans la croissance sous pression afin d'organiser les souches selon si leur impact est probable ou non.

Cela reste un projet d'envergure qui va demander du temps de développement et surtout du temps d'expérience.

Relaxation des contraintes

Une des études qui découle directement des expériences réalisées dans le chapitre 2 est l'étude de la relaxation des contraintes mécaniques sur les taux de croissance et de production de protéines. Pour cela il sera nécessaire d'utiliser les puces "Abate" présentées précédemment avec les souches de *S. cerevisiae* utilisées dans ce chapitre. Cela permettrait d'étudier la dynamique de ces phénomènes, ainsi que d'étudier comment les cellules peuvent récupérer de ces contraintes.

Compétition entre différents génotypes

Une des autres questions que nous nous sommes posés durant cette étude a été la question de la compétition entre différents génotypes. En effet, différents mutants pourraient avoir différentes sensibilités à la pression, et pourraient donc proliférer plus ou moins vite que la souche sauvage sous pression uniquement. Pour commencer à tester cette idée, nous avons utilisé une souche avec le gène codant pour la protéine Sfp1 délété, mutation qui est connue pour déclencher un ralentissement de la croissance dans les conditions normales. Nous mélangeons cette souche avec une souche WT, et regardons grâce à des marquages en fluorescence différents (Sfp1Δ en rouge, sauvage en vert) les taux de croissance en fonction de la pression pour les deux souches (Fig.4.12).

Nous remarquons ici que, bien que le mutant Sfp1Δ prolifère plus lentement en l'absence de pression, il prolifère plus vite que le sauvage sous pression.

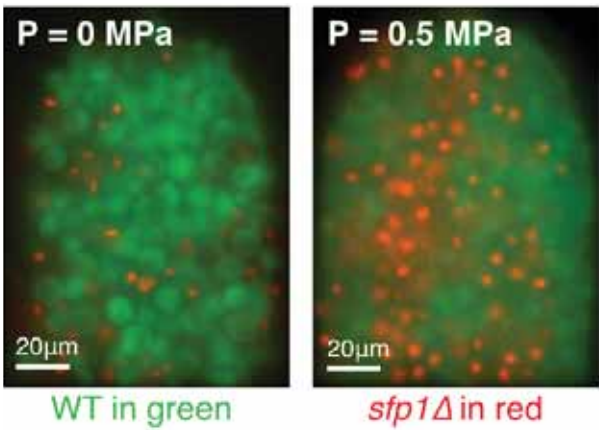


FIGURE 4.12 – Chambre microfluidique remplie avec un mélange de deux souches : une souche wild-type avec les cytoplasme marqué en GFP et Sfp1Δ - *HT2B-mCherry* une souche avec la protéine Sfp1 délétée et les histones marqués en mCherry. A gauche la chambre sans pression et à droite la chambre avec une pression de 0.5MPa

Il serait particulièrement intéressant de suivre la diffusion des GEMs dans ces cellules afin d'étudier une fois de plus le lien entre croissance et encombrements. Une hypothèse est que cette sensibilité différentielle proviendrait du fait que les cellules aient différents niveaux d'encombrement.

Cette étude de la compétition pourrait avoir des parallèles importants dans l'étude des cancers pour lesquelles différents génotypes compètent pour l'espace.

Lien entre taux de croissance et taux de division

Comme nous l'avons précisé plus en avant, le taux de division et le taux de croissance sont différents mais égaux sous pression. Si, dans le cas de notre sujet d'étude ils restent égaux, ceci pourrait ne pas être le cas de toutes les cellules (ex : *E. coli*, bactérie qui ne possède a priori pas de checkpoint de taille). Pour vérifier cette relation, il est donc nécessaire de mesurer ces deux taux à la fois avec un marquage des noyaux (comptage des cellules) et de l'exclusion de fluo (mesure du volume).

Cette étude nous permettra de mesurer pour différentes espèces mais aussi différentes mutations le lien entre ces deux taux, et en particulier ce qui les maintient égaux sous pression.

4.4.2 Conclusion

Nous avons donc vu dans ce chapitre que lorsque des cellules se développent dans des environnements spatialement limités, elles vont avoir un taux de croissance de plus en plus en faible avec l'augmentation de contraintes de croissance. Ce qui avait déja été montré dans la littérature [31]. Cependant nous avons pu montrer dans cette étude que cette diminution ne semble pas provenir, dans le cas de notre système d'étude *S. cerevisiae*, des voies de signalisation spécifiques à la viabilité sous pression (réseau SCWISh). Cependant, nous avons pu démontrer que cette diminution de la croissance était liée à une diminution du taux de production des protéines. La production semble limitée par l'encombrement des cellules qui augmente avec les contraintes de croissance. Pour finir, nous avons relié encombrement, pression, production protéique et croissance, à l'aide d'un modèle théorique, qui permet de prédire nos résultats expérimentaux avec uniquement des paramètres mesurés (paramétrisation totale du modèle).

La croissance est un des nombreux mécanismes biologiques complexes qui permettent aux cellules de vivre et se développer. Nous montrons que ce mécanisme est limité également par des propriétés biophysiques telles l'encombrement. Comment exactement cette limitation opère sur les protéines reste à découvrir, mais ce phénomène a de grandes chances d'être conservé dans le vivant. Il est de plus possible que cet encombrement ait un impact sur d'autres mécanismes biologiques, ou soit lui-même régulé. Dans le prochain chapitre, nous allons étudier l'impact du confinement et de l'encombrement associé sur d'autre mécanisme biologiques de la cellule.

Chapitre 5

Effet du confinement sur d'autre mécanismes biologiques

Dans les chapitres précédents, nous avons pu constater que lorsque des cellules sont confinées par leur environnement, elles vont développer une pression mécanique. Cette pression de croissance entraine une augmentation de l'encombrement dans ces cellules, qui va ralentir les réactions dans le cytoplasme.

L'encombrement est un phénomène biophysique, il est donc facilement imaginable qu'il impacte d'autres mécanismes biologiques. Dans ce chapitre, nous allons nous concentrer sur le lien entre encombrement et deux mécanismes particuliers : l'activité métabolique et la séparation de phase.

Pour l'étude du métabolisme, nous allons décrire les résultats réalisés lors d'une collaboration avec Venkata Suresh Vajrala et Jérome Launay de l'équipe MICA du LAAS-CNRS dans le cadre du développement d'un nouveau capteur électrochimique[111] (article en Annexe 2).

L'étude de la séparation de phase est un travail commencé récemment et toujours en cours. Les résultats présentés sont donc préliminaires. Ainsi, nos conclusions ne seront pas fermes et demanderont plus de travail afin d'être étayées.

5.1 Métabolisme

Le métabolisme cellulaire est le terme général qui désigne la capacité des cellules de produire de l'énergie au travers de la fabrication d'ATP, ainsi que d'autres briques élémentaires directement utilisables dans des voies de synthèses. Nous allons décrire dans ce chapitre l'activité métabolique amenant à la création de la brique élémentaire d'énergie, l'ATP, chez la levure *S. cerevisiae*, puis décrire notre méthode de mesure de cette activité métabolisme.

5.1.1 Principe général

La création d'énergie utilise deux mécanismes principaux qui sont la glycolyse et la respiration mitochondriale .Le premier, comme son nom l'indique, va utiliser et transformer le glucose dans le milieu pour fabriquer de l'ATP (environ 2 molécules par molécule de glucose) mais aussi d'autres briques élémentaires pour la cellule. Il peut être mesuré de différentes façons telles que la mesure de la consommation en glucose ou encore la production de lactate grâce à l'acidification du milieu extracellulaire[114]. En parallèle, la respiration mitochondriale (ou phosphorylation oxydative), va elle produire uniquement de l'ATP mais dans de plus grande quantité (38 molécules par molécule de glucose) et nécessite de l'oxygène. Elle peut en partie être mesurée par la mesure de la consommation d'oxygène par la cellule (d'où le terme de respiration).

La levure *S. cerevisiae*, lorsque qu'elle est placée dans des milieux de cultures riches en glucose, va favoriser la glycolyse et inhiber la respiration mitochondriale. C'est ce qu'on appelle l'effet Crabtree[49][93]. Comment ces réactions dépendent en particulier de l'encombrement macromoléculaire n'est pas connu, ni comment l'activité dans les cellules est lui-même relié à cet encombrement.

Afin de commencer à étudier ces questions, nous avons collaboré avec l'équipe MICA du LAAS-CNRS qui a développé une méthode innovante capable de combiner une mesure de la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu de culture, et une d'observation optique. Cette combinaison nous permettra de quantifier simultanément la respiration mitochondriale et d'étudier l'encombrement des cellules.

5.1.2 Principe de la puce

L'ensemble des méthodes de fabrication, calibration et utilisation de la puce que nous allons présenter sont développées dans l'article annexe 2 [111]. Cette puce a été développée par l'équipe

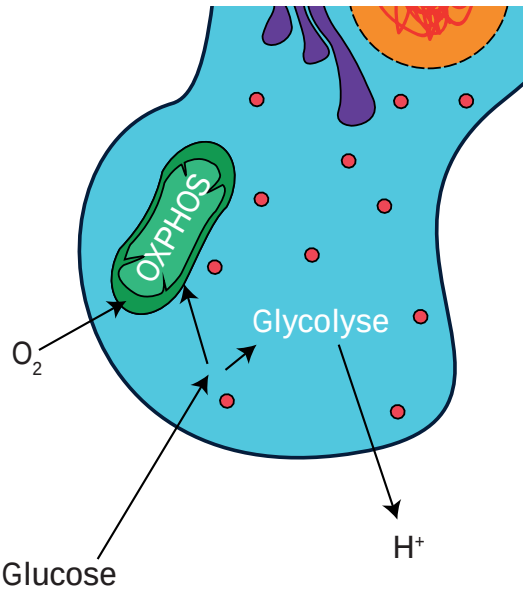


FIGURE 5.1 – Schéma simplifié du métabolisme dans la cellule. Le terme “OXPHOS” désigne la phosphorylation oxydative.

MICA, et nous l'avons utilisée en collaboration avec ceux-ci. Nous avons principalement réalisé les expériences biologiques, ainsi que les mesures et analyses optiques.

Cette puce est composée d'une multitude (1.610^5) de puits (Fig.5.2.a) dans lesquels les cellules vont être chargées, et à partir desquels nous allons mesurer par électrochimie le taux de consommation d'O2. En effet, ces puits possèdent des électrodes circulaires qui permettent de mesurer par voltamétrie cyclique, notamment, des espèces réactives comme l'oxygène. De plus, le fond du puits est fait en verre transparent et fin, permettant ainsi d'observer les cellules individuellement dans chaque puits en microscopie inversée. Nous observons par exemple dans la Fig.5.2.b, en épifluorescence, les noyaux de cellules marqués par un fluorophore (*HT2B-mCherry*).

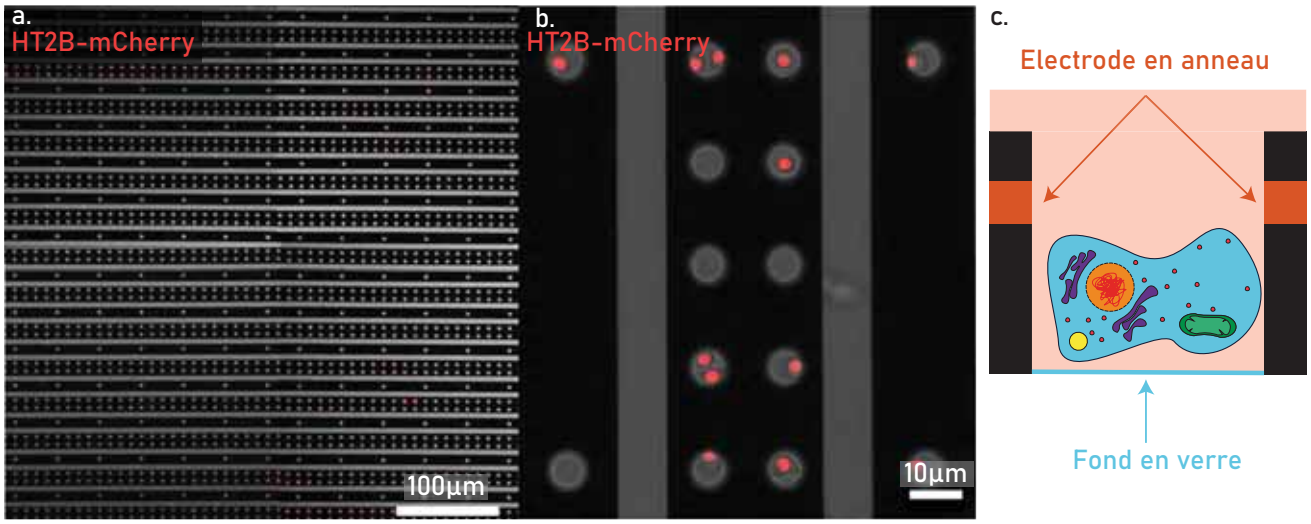


FIGURE 5.2 – Image de la puce électrochimique utilisée pour mesure la production de dioxygène dans laquelle sont placées des cellules avec un marquage de leur histone en fluorescence (HT2B-mCherry) avec : a. un vue avec un grossissement à 20x, b. une vue en 63x et en c. schéma d'un puits avec une cellule à l'intérieur.

Ce système va donc nous permettre de mesurer la production en dioxygène en parallèle de la diffusion sur les mêmes cellules. Notons que la mesure de la concentration d'oxygène se fait pour

l'instant sur de nombreux puits, alors que la mesure de diffusion par les GEMs se fait sur puits unique : il n'est pas encore possible d'adresser par électrochimie chaque puits individuellement.

5.1.3 Lien entre encombrement et respiration mitochondriale

Nous avons dans cette étude mesuré deux paramètres : l'encombrement macromoléculaire et la consommation d'oxygène. L'encombrement dans des cellules est d'abord mesurée par la diffusion des GEMs, les cellules étant placées dans des milieux de culture avec des concentrations en glucose variables. Précisons que nous avons complété le milieu de culture avec du sorbitol, afin de maintenir l'osmolarité constante en compensant le changement de concentration de glucose. Il est connu que l'utilisation de ces milieux à un impact sur le métabolisme[87]. Ceci va nous permettre d'étudier l'impact de ces milieux sur la consommation d'oxygène, et de déterminer comment la diffusion change en fonction de la consommation d'oxygène des cellules.

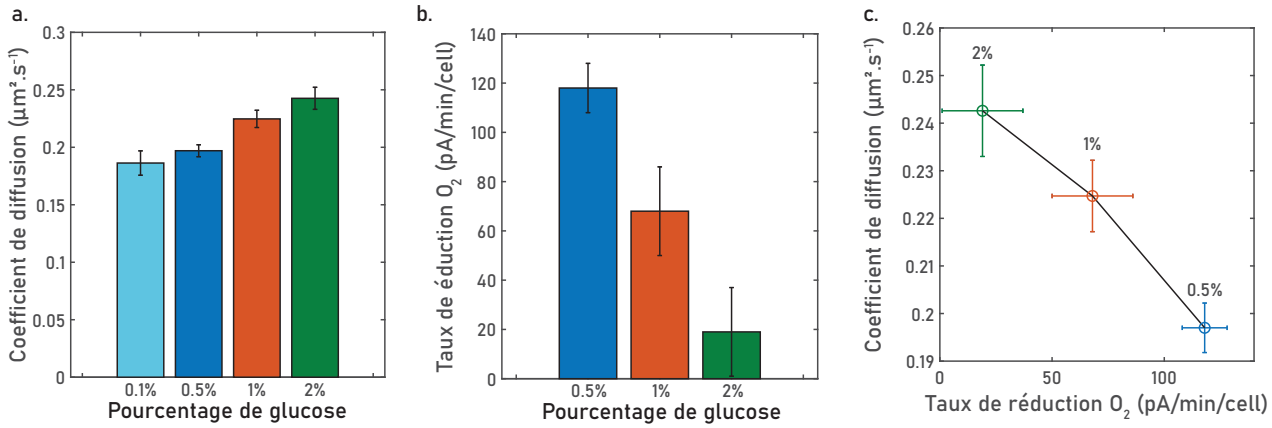


FIGURE 5.3 – a. Coefficient de diffusion des GEMs de 40nm pour des cellules dans des milieux avec une concentration en glucose différente. b. taux de réduction d'oxygène sur l'électrode pour des cellules dans des milieux avec une concentration en glucose différente. c. Coefficient de diffusion des GEMs de 40nm en fonction du taux de réduction d'oxygène sur l'électrode, métrique étant reliée au taux de consommation d'oxygène par les cellules.

Nous pouvons constater tout d'abord que lorsque les cellules sont placées dans des milieux pauvres en glucose mais d'osmolarité constante, la diffusion intracellulaire va ralentir (Fig.5.3.a).

En parallèle, nous observons que ces cellules vont consommer de plus en plus d'oxygène lorsque cette concentration en glucose diminue (Fig.5.3.b) : nous retrouvons bien ici l'effet Crabtree d'inhibition de la respiration lorsque le glucose est abondant (la mesure n'a pas été faite pour la concentration la plus faible en glucose de 0.1% pour des raisons techniques).

Ensemble, ces résultats suggèrent une anti-corrélation entre la respiration mitochondriale et la diffusion dans la cellule (Fig.5.3.c). La raison de cette anti-corrélation n'est pas connue, et pourrait avoir de multiples sources. Par exemple, la taille des protéines employées pour la respiration pourrait être différente de celles employées pour la glycolyse et donc amener à un plus gros encombrement. Il se pourrait aussi que le volume cellulaire soit affecté par ce manque de glucose, et que la cellule soit plus petite, et plus encombrée, cette anti-corrélation n'ayant pas forcément de causalité.

Notre objectif dans l'article pour lequel cette étude a été réalisée était de prouver que le dispositif développé était capable de faire des mesures électrochimiques et optiques en même temps. Ce dispositif reste très utile pour étudier le lien entre encombrement et activité métabolique.

Il reste de nombreuses questions à répondre pour comprendre le lien entre métabolisme et encombrements dans la cellule. La principale de ces questions serait d'étudier la réciproque, à savoir, quel serait l'impact de l'encombrement sur le métabolisme en réalisant par exemple des

chocs osmotiques dans les puces. Plusieurs études montrent en effet un lien potentiel entre le types de métabolisme d'une cellule et l'encombrement[89][120].

Nous allons maintenant étudier le lien entre encombrement et un autre phénomène cellulaire qui lui est intrinsèquement relié : la séparation de phase. Les résultats présentés ci-après sont également préliminaires, et posent les bases de futurs études sur le sujet.

5.2 Lien entre encombrement et séparation de phase

La séparation de phase "liquide-liquide" est un phénomène physique que l'on retrouve également dans les cellules. Le principe de base est que lorsque plusieurs espèces ne sont pas miscible, elles peuvent former des phases séparées. L'exemple le plus simple et connu est la vinaigrette. Dans ce cas l'huile et le vinaigre ne se mélangent pas et forment deux phases bien distinctes (Fig.5.4.a). Cette séparation de phase est liée à une concentration critique qui, lorsqu'elle est dépassée, entraine la formation de germes de l'un des composants dans la phase de l'autre. Ces germes peuvent grossir, et coalescent à la manière de gouttes liquides, pour former une phase toujours plus importante. Cette concentration critique dépend de paramètres intrinsèques au système : interaction entre les molécules, rigidité des protéines, ou encore leurs complexités (des domaines désordonnés ont par exemple tendance à interagir). Elle dépend aussi de paramètres externes comme la température, les propriétés rhéologiques, ou la présence d'autre molécules (Fig.5.4.b).

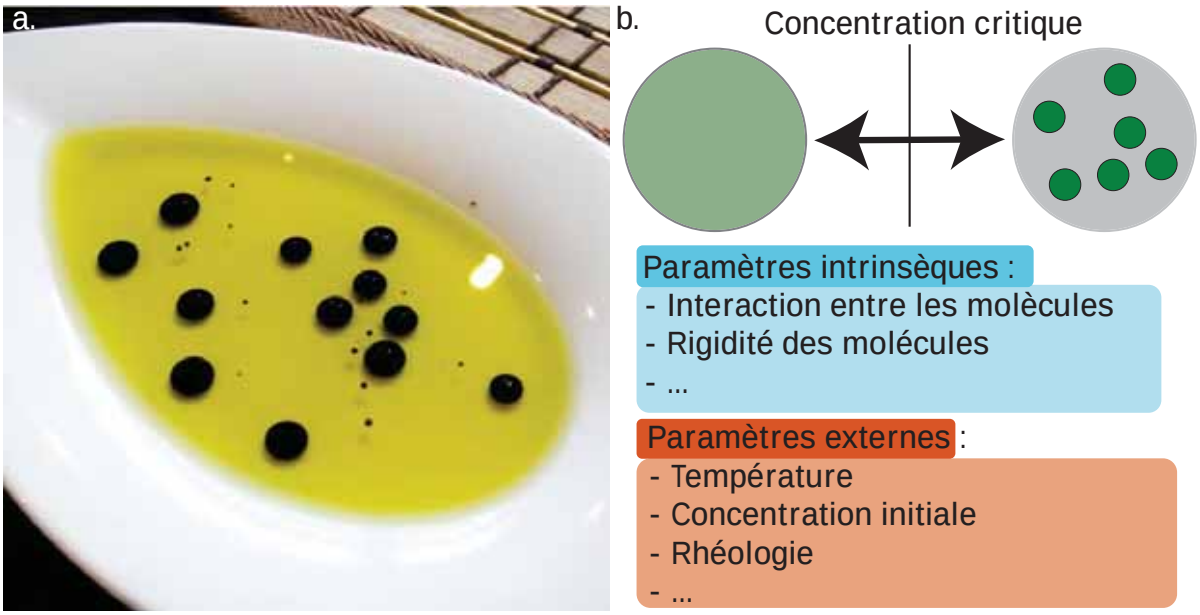


FIGURE 5.4 – a. Image d'un mélange avec de la séparation de phase entre huile et vinaigre. b. Schéma du principe de concentration critique menant à la séparation de phase.

5.2.1 Séparation de phase dans les cellules

Dans les cellules, nous retrouvons ce phénomène de séparation de phase dans le cas de compartiment tels que le nucléole, précédemment étudié dans le chapitre 2, compartiment dans lequel sont fabriqués les ribosomes [12]. Les centrosomes[66], les corps de Cajal [42] ou les objets que nous allons étudier dans ce chapitre, à savoir les granules de stress et *P-bodies*[20][29], sont d'autres exemples de séparation de phase liquide-liquide dans les cellules.

L'interaction entre le cytoplasme et ces compartiments sans membranes est de type liquide-liquide. La séparation de phase a lieu car les composants de ces compartiments ont une affinité plus grande entre eux qu'avec les molécules du cytoplasme.

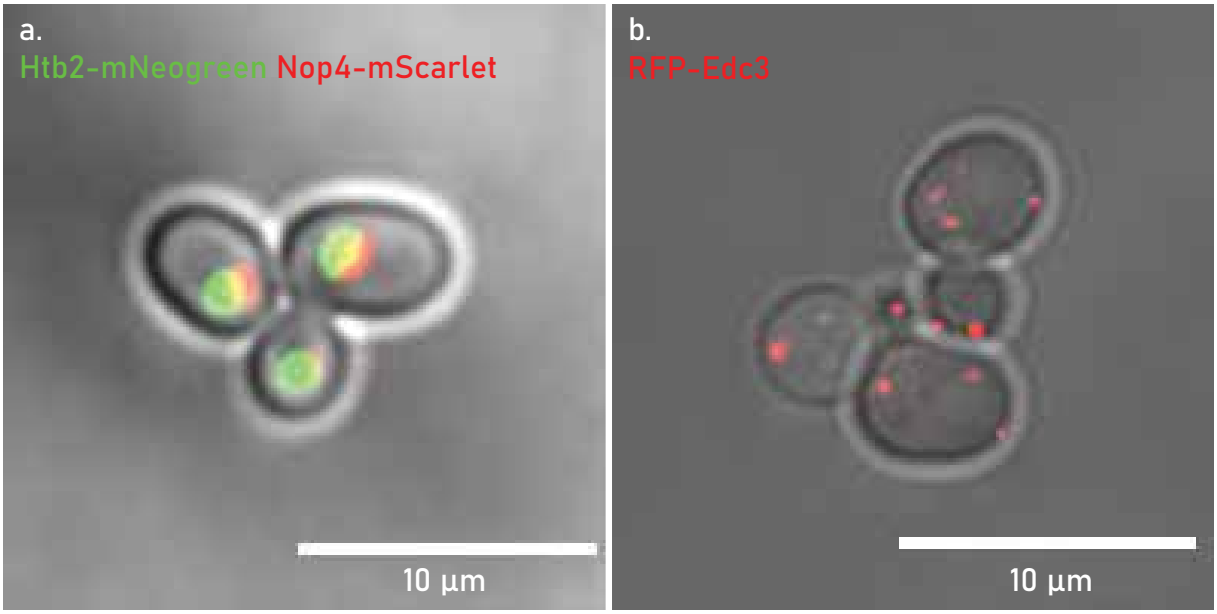


FIGURE 5.5 – a. Image d'un nucléole en rouge dans une *S. cerevisiae* avec un marquage du noyau en vert. b. Image de *P-bodies* obtenue grâce à une protéine RFP marquant la protéine Edc3

Une augmentation de l'encombrement peut amener à une augmentation de la séparation de phase, comme il a été montré précédemment[30]. De plus, la séparation de phase étant sensible à l'encombrement, nous pouvons légitimement nous demander quel lien il pourrait y avoir entre la création de structures de séparation de phase pour répondre à une augmentation de l'encombrement.

Regardons dans un premier temps un système synthétique nous permettant d'étudier l'impact de l'encombrement sur la séparation de phase, en l'absence de régulation spécifique.

5.2.2 Un outil pour l'étude de la séparation de phase dans les cellules : SUMO-SIM

Le système SUMO-SIM a été développé dans l'article de "Banani et al." [7]. Il consiste en deux protéines pouvant interagir : l'une est composée de répétions d'une plus petite protéine provenant de cellule humaine : SUMO (pour "Small ubiquitin-related modifier"). L'autre de répétions de SIM (pour "SUMO Interaction Motif") qui, comme son nom l'indique, va interagir avec la protéine SUMO. Le système synthétique consiste en une construction de 10 répétitions de SUMO juxtaposées à 6 répétions de SIM, puis à une mCherry, permettant la visualisation. Cette construction interagit avec elle-même et forme une phase liquide, observable en fluorescence (Fig.5.6.a).

Ce système a précédemment été utilisé dans "Delarue et al., Cell 2018" [30] afin d'étudier l'impact de la concentration en ribosome sur la formation des complexes SUMO-SIM (Fig.5.6.b).

Dans notre étude, nous allons voir quels sont les effets du confinement des cellules sur le complexe SUMO-SIM.

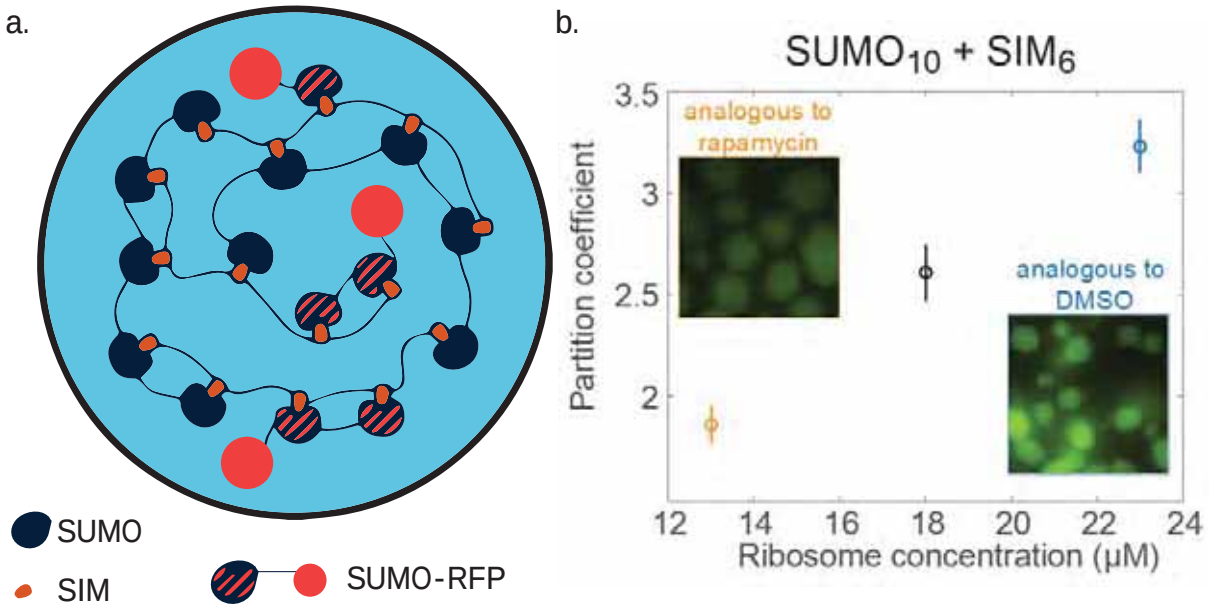


FIGURE 5.6 – a. Schéma du complexe SUMO-SIM avec un marquage en RFP (illustration issue de l'article "Banani et al." [7] b. Impact *in vitro* de la concentration en ribosome purifiés sur le coefficient de partition de SUMO-SIM représentant la fluorescence dans les puncta comparée à la fluorescence dans le milieu de culture (graphe issu de "Delarue et al " [30])

5.2.3 Séparation de phase et confinement

Pour confiner les cellules nous allons une fois de plus utiliser nos chambres microfluidiques "self-closing". Nous allons utiliser une souche de levure induisant dans son cytoplasme une structure SUMO-SIM incorporant de la mCherry, comme détaillée précédemment.

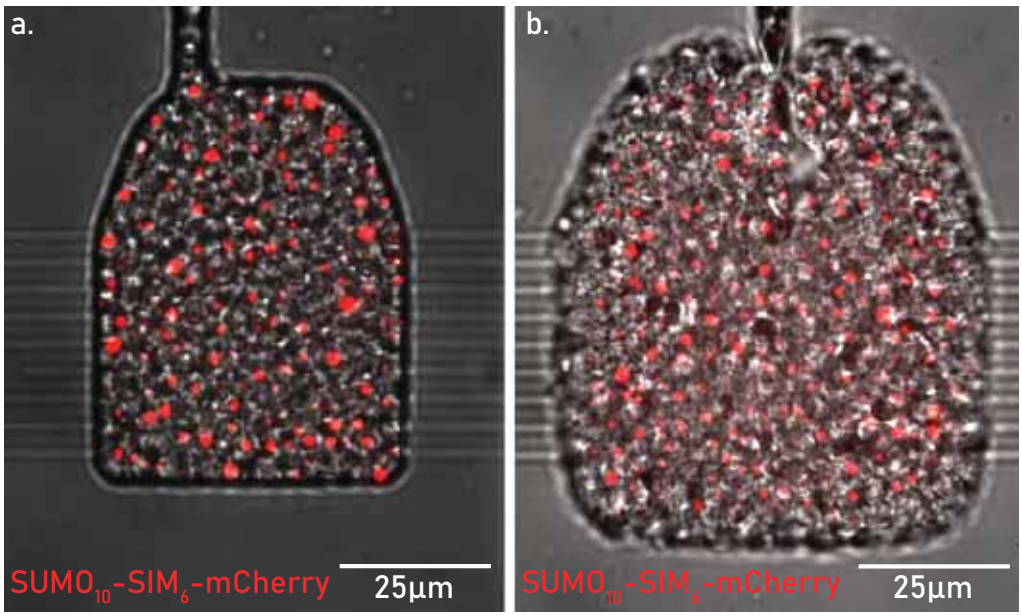


FIGURE 5.7 – a. Image d'une chambre microfluidique pleine de cellules contenant la structure SUMO-SIM incorporant une protéine mCherry avant l'émergence de la pression de croissance. b. Image de la chambre précédente après 15 heures de croissance et avec une pression induite par la croissance d'environ 0.4MPa

A l'aide de Matlab, nous avons détecté les puncta formés par les complexes SUMO-SIM, par un seuillage classique. Puis nous avons estimé leurs nombres par cellules et leurs tailles à l'aide d'une fonction basée sur la transformée de Hough, qui permet de détecter des objets circulaires.

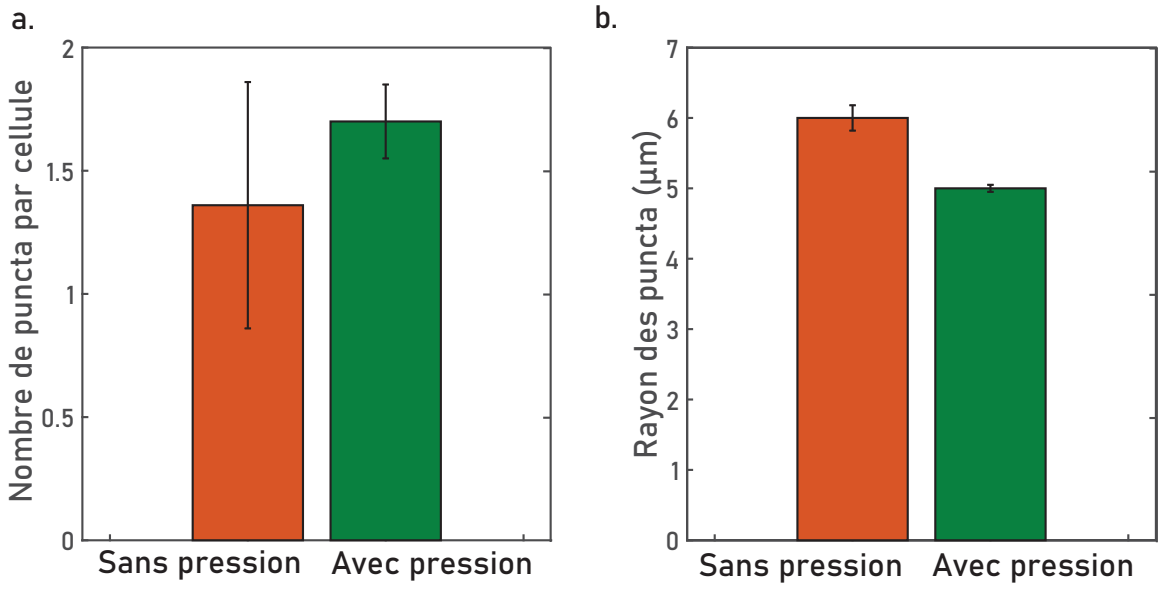


FIGURE 5.8 – a. Mesure du nombre de puncta de SUMO-SIM par cellule dans les chambres pour les conditions sans et avec pression. b. Rayon de puncta de SUMO-SIM dans les chambres pour les conditions sans et avec pression.

Nous pouvons constater que le nombre de puncta de complexe SUMO-SIM par cellules semble augmenter, indiquant une potentielle augmentation de la séparation de phase (Fig5.8.a). De manière intéressante, le rayon de ces puncta diminue avec la pression (Fig5.8.b). Il n'est pas impossible que l'augmentation de l'encombrement comprime ces structures, de la même manière que le nucléole semblait comprimé. Il nous faudrait mesurer l'intensité de fluorescence par puncta, rapportée à l'intensité cytoplasmique, pour conclure sur une augmentation de la séparation de phase sous contrainte compressive.

Quoiqu'il en soit, nous avons un complexe effectuant de la séparation de phase dans les conditions normales de culture des cellules, et qui semble être impacté par la génération de pression de croissance et l'augmentation de l'encombrement.

Le complexe SUMO-SIM est un outil synthétique pour étudier la séparation de phase dans les cellules. Nous allons maintenant regarder des espèces régulées qui effectuent de la séparation de phase : les granules de stress et les *P-bodies*.

5.2.4 Les *P-bodies* et les granules de stress

Les *P-bodies* et les granules de stress font parties des compartiments de la cellule qui n'ont pas de membranes et qui se forment par séparation de phase. Les *P-bodies* sont le lieu d'une partie de la dégradation des ARN messagés, tandis que les granules de stress apparaissent lorsque les cellules sont stressées pour protéger ces mêmes brins d'ARN messagers.

Nous allons dans un premier temps étudier les granules de stress lorsque les cellules sont confinées.

Les granules de stress sous confinement

Nous allons nous intéresser à l'évolution des granules de stress lorsque les cellules sont sous pression. Nous avons réalisé cela en marquant les protéines Ded1 et Pab1 avec une protéine fluo-

rescente RFP.

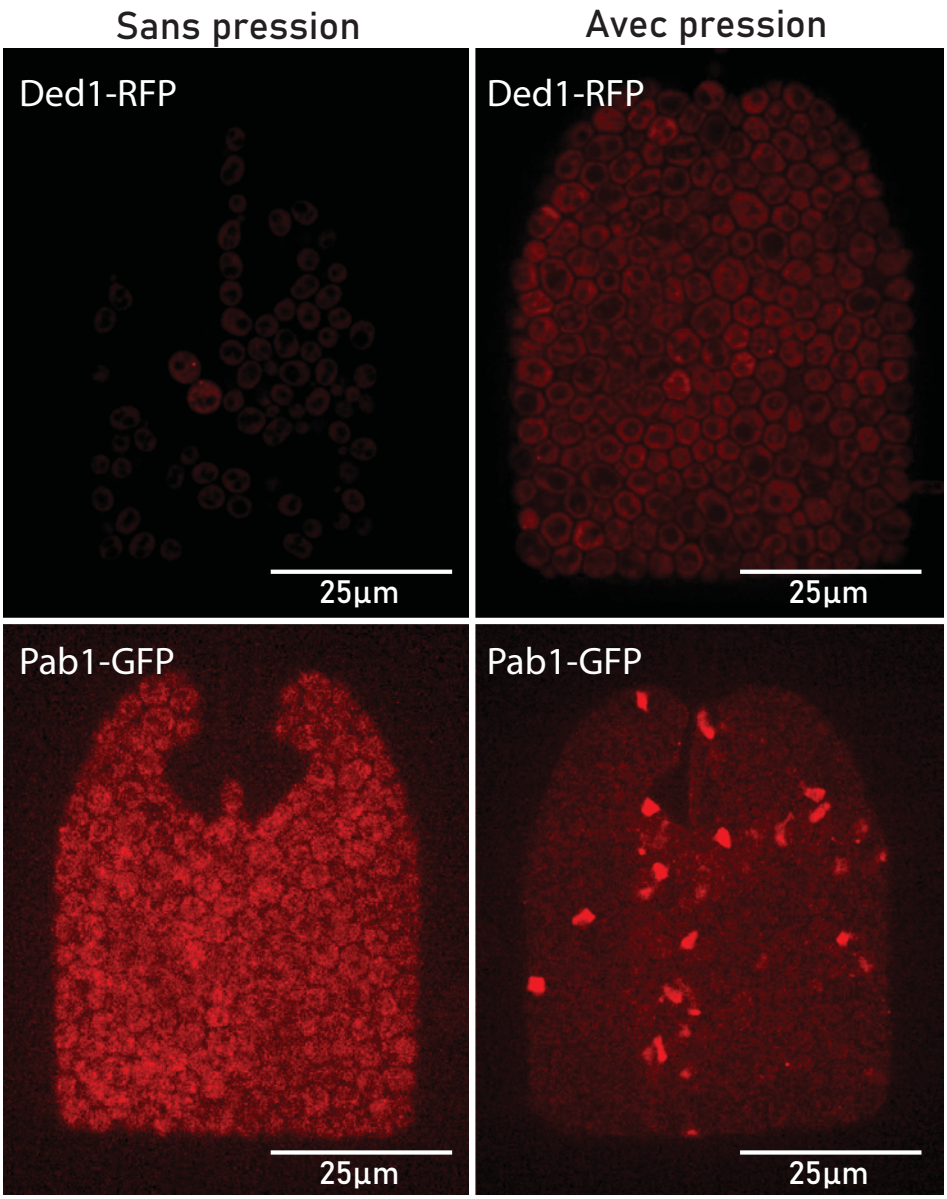


FIGURE 5.9 – a. *Ded1-RFP* sans pression et avec pression. b. *Pab1-RFP* sans pression et avec pression.

Nous pouvons noter, qu'il n'y a pas d'apparition de granules de stress sous pression, ni également lors du chargement de la puce. Ceci semblerait signifier que les granules de stress ne sont pas sensibles à ce type de contraintes. D'ailleurs, il a été montré qu'elles n'étaient pas induites par des contraintes osmotiques [19].

Nous venons donc de voir que la pression n'induit pas la séparation de phase pour des espèces des granules de stress. Nous allons maintenant étudier l'impact de la pression sur les *P-bodies*.

P-bodies sous confinement

Afin d'étudier l'effet du confinement sur la séparation de phase des *P-bodies*, nous avons utilisé une série de composants protéiques de ces structures marqués avec une protéine fluorescente, et observé l'évolution de ces marqueurs en fonction de la pression induite par la croissance.

Nous allons comparer comme précédemment les cellules soumissent ou non à la pression induite par la croissance, et compter le nombre de *P-bodies* marqués par cellule ainsi que le volume

de ces puncta. Les protéines marquées en fluorescence RFP sont Dcp1, Dcp2 et Edc3.

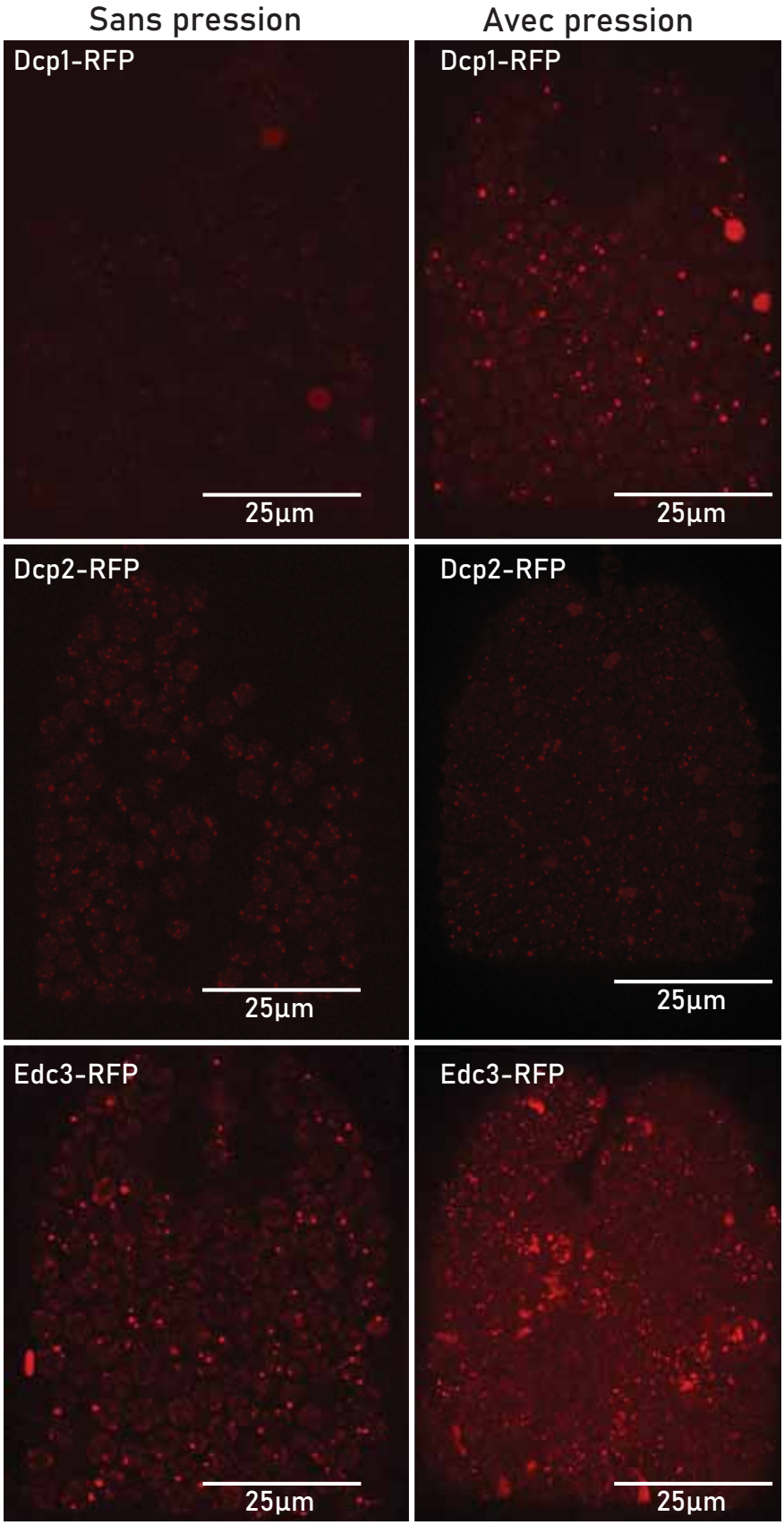


FIGURE 5.10 – a. *Dcp1-RFP* sans pression et avec pression. b. *Dcp2-RFP* sans pression et avec pression. c. *Edc3-RFP* sans pression et avec pression.

Nous pouvons remarquer que même lorsque les cellules ne subissent pas de contraintes mécaniques, elles semblent induire des *P-bodies* sous forme de puncta.

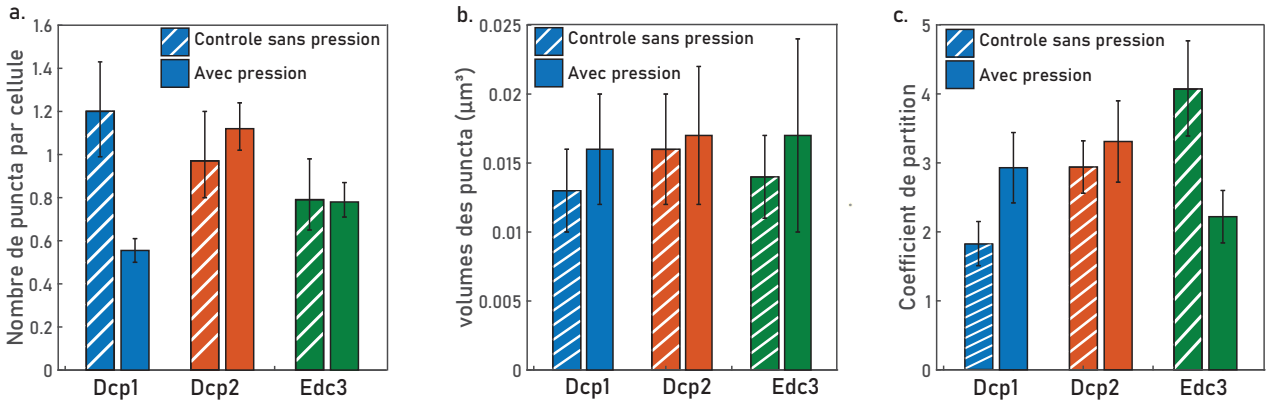


FIGURE 5.11 – a. Mesure de différent paramètre en bleu pour les cellules ayant leur protéines Dcp1 marquée, en orange pour Dcp2 et en vert pour Edc3. Les barres hachurées représentent les cellules non soumissent à la pression induite par la croissance et les barres pleines les cellules sous pressions. a. Nombre de puncta par cellule. b. Mesure du volume des puncta. c.Mesure du coefficient de partition des puncta (intensité moyenne des puncta divicée par l'intensité du cytoplasme des cellules).

Nous avons comparé comme précédemment le nombre de puncta par cellule ainsi que les volumes de ces puncta. Nous ne trouvons pas de différence significative entre les cellules soumisent ou non à la pression induite par la croissance à l'exception du nombre de puncta par cellules qui semble diminuer avec la pression dans le cas des cellules ayant leurs protéines Dcp1 marquées en fluorescence (Fig.5.11.a). Pour les volume nous pouvons cependant noter une augmentation d'environ 15-20 % pour les puncta de Dcp1 et Edc3 sous pression ce qui indiquerait un enrichissement des puncta en protéines (Fig.5.11.b). Malheureusement les statistiques actuelles de ces expériences ne nous permettent pas de conclure fermement sur ces résultats. L'étude du coefficient de partition, déterminé grâce au rapport de la fluorescence moyenne des puncta et de la fluorescence du cytoplasme confirme notre hypothèse de concentration de la protéine dans Dcp1 dans les *P-bodies* lorsque les cellules sont sous pression(Fig.5.11.c). Cependant nous pouvons noter un comportement inverse pour la protéines Edc3. Ceci nous indique qu'il est possible que le comportement sous pression des protéines composants les *P-bodies* soit différent. Cette réponse variable selon le stress a d'ailleurs été montré dans le cas des granules de stress [128].

Il sera donc nécessaire de poursuivre cette étude en augmentant la quantité de données mais aussi en observant d'autre protéines des *P-bodies*.

Notons que la formation de ces structures normalement non présentes dans les cellules est peut-être due à un stress lors du chargement de la puce microfluidique. Bien que les cellules aient eu du temps pour relaxer, ce temps n'a peut-être pas été suffisant. En effet, lorsque nous observons les cellules dans de larges canaux (Fig.5.12), nous remarquons que les puncta semble moins présent et n'ont pas la même forme. Ceci nous indique que le simple remplissage des chambres par les cellules suffit à les stresser et donc à changer la morphologie de leurs *P-bodies*. Il sera donc nécessaire de modifier le protocole de remplissage des chambres. Si nous comparons en effet les résultats sous pression à ce qui semble être des contrôles moins stressés, alors les contraintes mécaniques semblent définitivement associées à une augmentation de la quantité de *P-bodies*.

Comme préciser dans l'introduction, ces expériences font parties des perspectives des travaux réalisés durant ces travaux de thèse et donc seront poursuivies après la fin de celle-ci, afin d'affiner les méthodes de quantifications et notamment les protocoles de remplissage des chambres.

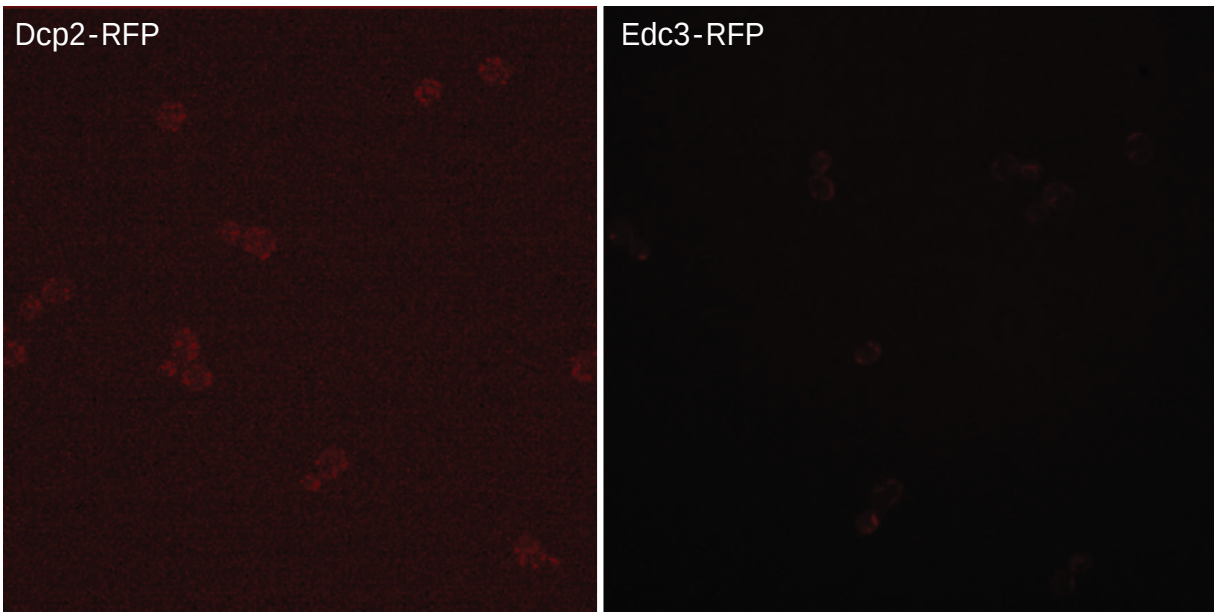


FIGURE 5.12 – a. *Dcp2-RFP* dans un grand canal. b. *Edc3-RFP* dans un grand canal.

5.2.5 Impact du confinement sur des mutants de *P-bodies*

Dans cette dernière partie, nous allons étudier l'impact de la désactivation de certaines protéines composant les *P-bodies* : Edc3 et Pat1. Pour observer cette impact, nous allons marquer une autre protéine de *P-bodies* en fluorescence Dcp2. Comme précédemment nous allons regarder les cellules avant l'apparition de la pression et environ 10h après celle-ci.

Nous pouvons constater plusieurs points saillants :

1. Pour les cellules Pat1Δ, nous observons une très faible séparation de phase avec et sans pression, peut-être plus importante sous pression.

2. Pour les cellules Edc3Δ, nous constatons au contraire que les *P-bodies* ne font plus de séparation de phase même sous pression.

3. Enfin, pour les cellules double knock-out, nous pouvons faire les mêmes observations que pour les EDC3Δ, mais nous pouvons aussi noter une augmentation de la mort de cellules sous pression, que nous observons par la présence de débris cellulaires autofluorescents. Les cellules semblent également générer moins de pression.

Ainsi, les cellules mutantes avec une partie des *P-bodies* désactivés nous permettent de constater que les *P-bodies* semblent importantes sous pression pour maintenir une certaine forme de viabilité, et de capacité à développer de la pression. En effet, ces structures semblent se former facilement sous pression, même lors du chargement. Ces résultats très intéressants appellent à de plus amples analyses, notamment de la capacité des cellules à proliférer dans ce mutant sous pression.

Pour conclure ce chapitre et afin de revenir sur les différents phénomènes qui nous avons décrit dans ce manuscrit, il sera particulièrement important de suivre la diffusion ainsi que le taux de croissance dans ces cellules mutées en fonction de la pression induite par la croissance. Cela afin de voir si séparation phase peux servir aux organismes comme moyen de contrer l'encombrement de leurs cytoplasmes causés par le confinement, en ségréguant de l'ARN message par exemple, ou en induisant une dégradation de ceux-ci, ayant pour but d'adapter la cellule à cet environnement de plus en plus encombré.

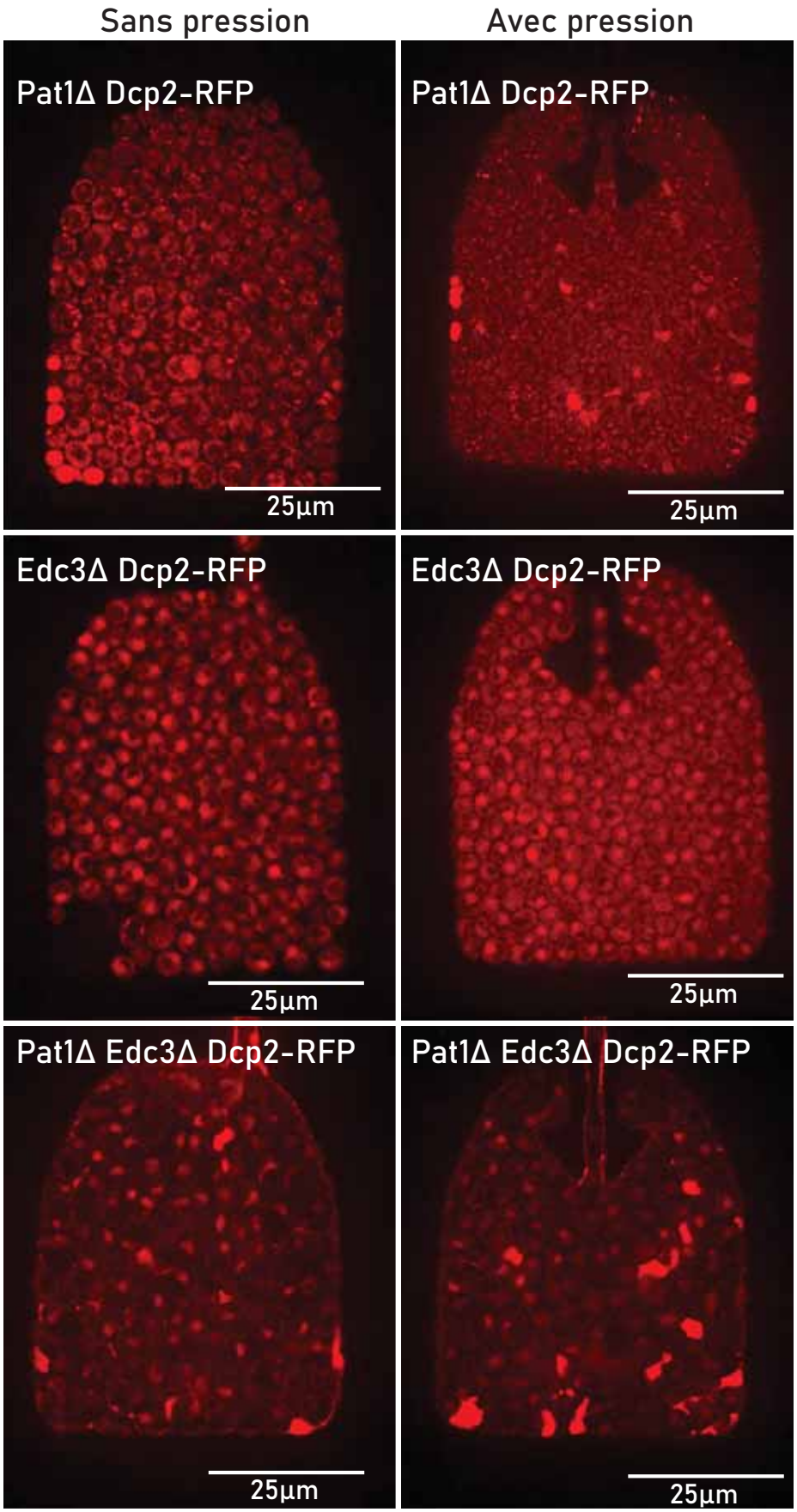


FIGURE 5.13 – a. *Pat1Δ Dcp2-RFP* sans pression et avec pression. b. *Edc3Δ Dcp2-RFP* sans pression et avec pression. c. *Pat1Δ Edc3Δ Dcp2-RFP* sans pression et avec pression.

5.3 Conclusions et perspectives

Nous venons donc de voir que l'encombrement est relié à d'autres mécanismes que la croissance cellulaire ou la production protéique (même si, dans le cas de la séparation de phase, plus de travail est nécessaire pour avoir une conclusion plus nette). Nous allons évoquer dans la partie perspective d'autre mécanisme qui pourraient être impactés par l'encombrement.

5.3.1 Perspective

Autres mécanismes potentiels de régulation de l'encombrement :autophagie et vacuole

Nous nous sommes intéressés à la séparation de phase et en particulier aux *P-bodies* pour une raison spécifique. Nous pensons en effet que cette dernière peut-être intrinsèquement reliée à la régulation de l'encombrement par la cellule. Cependant, il pourrait exister d'autres moyens pour les cellules de réguler leurs encombrements, comme le contrôle de la vacuole ou l'autophagie. La vacuole est le plus gros des organelles, sa variation de volume pourrait particulièrement impacter l'encombrement macromoléculaire cytoplasmique. Il sera donc particulièrement intéressant d'étudier la taille de la vacuole lorsque que les cellules sont confinées. Enfin, l'autophagie est reliée à l'activité catabolique des cellules : la diminution du nombre global de protéines pourrait être un autre moyen de désencombrer une cellule encombrée. Ainsi, suivre la production des protéines impliquées dans l'autophagie en fonction de la pression induite par la croissance pourrait s'avérer intéressant.

Étude de la mitochondrie

Une étude qui pourrait être intéressante et liée au métabolisme est l'étude de la mitochondrie. L'organelle étant complexe et possédant ses propres membranes, plusieurs études peuvent d'être réalisée.

1. La dynamique de la morphologie de la mitochondrie qui forme un réseau qui peut fissionner et fusionner lors de stress[10]. Pour cela plusieurs méthodes comme le marquage des membranes ou la mesure de la présence de protéines liée à l'un ou l'autre des phénomènes.
2. La diffusion dans la mitochondrie grâce à des GEMs exprimées spécifiquement dans celles-ci, en utilisant une stratégie similaire au ciblage de ces particules dans le noyau.
3. L'efficacité de la respiration mitochondriale sous contrainte mécanique et osmotique, grâce par exemple à des protéines marquées ou à de des mesures en électrochimie.

5.3.2 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre, dans le cadre du développement d'un nouvel outil de mesure du métabolisme de cellules, combinant à la fois mesure en électrochimie et mesure optique, que l'encombrement dans les cellules est anti-corrélé à la production d'oxygène. L'origine de cette anti-corrélation reste à élucider, ainsi que le lien qui peut exister entre encombrement et activité métabolique.

Nous avons également étudié et présenté des résultats préliminaires de l'impact de la pression sur la séparation de phase dans le cytoplasme. Nous avons pu constater qu'il semble y avoir un effet de concentration des protéines faisant de la séparation de phase lorsque les cellules sont confinées, ce qui est cohérent avec les résultats de la littérature[30]. Cependant cette étude n'étant qu'à ces débuts, plus d'expériences ainsi que des analyses plus poussées seront nécessaire afin de conclure fermement. Il semblerait néanmoins que la formation de structures de type *P-bodies* soit reliée à la survie et à l'adaptation des cellules sous contraintes compressives.

Chapitre 6

Discussion et perspectives générales

6.1 Conclusion

Pour conclure ce manuscrit, revenons sur les différents points que nous avons développés dans celui-ci.

Développement de pression de croissance lors de la prolifération cellulaire dans un milieu confiné

L'objectif tout au long de ce manuscrit a été d'étudier les impacts de la croissance sous confinement. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés au système d'étude *S. cerevisiae*, la levure du boulanger.

Le premier phénomène lié à cette croissance sous confinement est l'apparition de forces qui vont être développées par les cellules afin de déformer leur environnement et leur permettre d'augmenter leur volume cellulaire, nécessaire avant leur division. L'ensemble de ces forces génèrent, à l'échelle de la population, une contrainte appelée pression de croissance. Nous avons ainsi présenté un système permettant de mesurer la pression induite par la croissance, redéveloppé et adapté à partir de [31].

La pression de croissance a un impact important sur la croissance, rétroagissant sur cette dernière de laquelle elle émerge pourtant. L'étude de l'impact du confinement n'est pas une question évidente ni négligeable. En effet, ces contraintes se retrouvent dans de nombreuses instances comme dans le cas des cancers solides. Des études précédemment réalisées par notre groupe et d'autres rapportent une diminution de la prolifération sous confinement chez différents organismes, allant des cellules végétales [39, 15] aux cellules mammifères[53, 99], en passant par les fongus[31, 32] et les bactéries [25, 109] [31].

Y a-t-il une raison commune à ces organismes qui amènerait à une telle réduction de la prolifération ? Une piste que nous avons étudiée durant ce manuscrit est celle de l'encombrement macromoléculaire, notion reliée à la grande concentration en macromolécules dans les cellules. Afin de mesurer celui-ci, nous avons utilisé des nanoparticules, les GEMs[30], spécialement crées pour mesurer l'encombrement par leur diffusion, sans perturber a priori la cellule.

Modélisation de l'encombrement dans la cellule

Afin d'expliquer le mouvement des particules dans les cellules, nous avons tout d'abord défini le mouvement brownien et comment il pouvait être décrit à l'aide de mesurables spécifiques. Nous avons pu constater à l'aide de ces mesurables que le mouvement de particules dans le cytoplasme n'était pas compatible avec un mouvement brownien, mais qu'au contraire ce mouvement semblait ralenti.

Nous avons alors proposé l'hypothèse que ce ralentissement était principalement dû à l'encombrement à l'échelle de la dizaine de nanomètres dans la cellule, échelle à laquelle les ribosomes occupent un volume important dans le cytoplasme, de 20 à 25%. Pour confirmer notre hypothèse, nous avons réalisé une simulation de sphères dures composée de ribosomes et d'un traceur similaire aux particules utilisées expérimentalement. Ceci nous a permis de conclure que l'encombrement des ribosomes n'était pas suffisant pour tout expliquer, et qu'il était nécessaire de tenir compte également de l'impact des objets plus petits dans la cellule, amenant à une viscosité effective plus grande que celle de l'eau. Lorsque cette viscosité est prise en compte et que l'on calibre notre simulation à l'aide de résultat expérimentaux, celle-ci semble capable de reproduire le mouvement d'une particule dans une cellule.

Une fois que quelques améliorations seront réalisées, particulièrement au niveau du temps de calcul, cette simulation permettra de tester certaines hypothèses sur le déplacement dans les

cellules tels que l'impact de l'activité ou le confinement par des plus gros objets (organelles ou mur de la cellule).

Le confinement cellulaire diminue la diffusion dans les cellules en augmentant l'encombrement

Après avoir vu comment se déplacent des particules dans le cytoplasme des cellules, nous avons utilisé ces particules, les GEMs, pour décrire la diffusion dans les cellules proliférant sous confinement.

Pour cela nous avons été amenés à définir plus en détail la pression induite par la croissance. En expliquant dans un premier temps comment nous la mesurions dans notre système expérimental, nous avons ensuite décrit le principe physique de pression de turgescence et comment ce dernier était compatible avec l'émergence de la pression induite par la croissance. Cette dernière semble donc émerger par l'accumulation naturelle d'osmolytes, nécessaire à la croissance, mais dont la concentration augmente à cause de la limitation de l'expansion cellulaire, le volume cellulaire moyen restant constant sous pression. Cette "surpression" osmotique serait la pression de croissance, appliquée sur l'environnement direct des cellules (autres cellules et parois de la chambre).

Nous avons ensuite montré que le confinement, et donc la pression induite par la croissance, était reliée à une diminution de la diffusion dans les cellules. À l'aide d'une étude basée sur des expériences de relaxations des contraintes de compression et de l'étude du volume du noyau des cellules, nous avons pu montrer que la cause de la diminution de la diffusion était dû à l'augmentation de la concentration en macromolécules dans les cellules. Notre hypothèse, qui semble bien vérifiée, est que sous confinement, les cellules accumulent de "tout" de manière proportionnelle : osmolytes, mais aussi protéines et autres complexes protéiques. Cette augmentation proportionnelle amène donc à une augmentation concomitante de la pression de croissance avec l'encombrement.

Les prochaines étapes de cette étude seront le développement d'un système permettant une observation de la relaxation des contraintes sur plusieurs chambres, ainsi qu'une analyse de la diffusion suivante les différentes étapes du cycle cellulaire, mais aussi de comment l'encombrement peut varier dans différents sous-compartiments cellulaires.

Le confinement cellulaire ralentie la croissance en diminuant la production des protéines par une augmentation de l'encombrement

Dans le troisième chapitre, nous sommes revenus sur le fait que la prolifération diminuait lorsque les cellules étaient confinées. Nous avons donc commencé par définir le paramètre de taux de croissance, et avons montré comment nous pouvions le mesurer dans notre système expérimental. Nous avons constaté une diminution du taux de croissance en fonction de la pression de croissance, diminution qui semble suivre une loi exponentielle.

Nous avons ensuite travaillé sur une première hypothèse, qui était que la régulation de la croissance sous pression se faisait *via* une voie de signalisation. Pour cela, nous avons étudié des mutants appartenant à un réseaux mécano-sensible (réseau SCWISh [32], réseau identifié comme modulant la survie et la division sous contrainte compressive. Nous avons mesuré le taux de division sous pression de ces mutants, et avons observé que ceux-ci ne semblaient pas être reliés à la diminution de croissance observée. Bien que cela ne veuille pas forcément dire qu'il n'y a pas de régulation biologique de la croissance, ces résultats, bien qu'à renforcer, suggèrent qu'il pourrait exister une autre raison, probablement superposée à de la régulation biologique, à la diminution du taux de croissance.

Ceci nous a amené à proposer l'hypothèse suivante : l'augmentation de l'encombrement, montrée précédemment, ralentirait la croissance par un ralentissement de la production des protéines. Pour vérifier cela, nous avons mesuré le taux de production d'une protéine fluorescente inductible. Ceci nous a permis de confirmer que, non seulement l'augmentation de l'encombrement entrainait une diminution de la production de la protéine, mais aussi que cette production de protéines limitait *in fine* la croissance, et était donc responsable en parti du ralentissement de celle-ci.

Nous avons donc une hypothèse solide sur l'origine de la diminution de la croissance sous confinement, qui nous a permis de créer un modèle capable de prédire différents résultats expérimentaux.

La suite de cette étude comportera deux axes principaux : la vérification d'autres voies de signalisation afin de confirmer que le ralentissement de la croissance sous confinement provient de l'encombrement, mais que certaines voies pourraient adapter ce dernier de manière à moduler la croissance, et la validation de ces théories chez différents organismes.

Le confinement cellulaire perturbe d'autres mécanisme biologique dans les cellules

Pour terminer, nous nous sommes intéressés à deux autres mécanismes biologiques : le métabolisme et la séparation de phase dans les cellules.

Pour le premier, nous avons pu voir à l'aide d'un dispositif innovant, mêlant mesures électrochimique et optique, que les cellules utilisant la respiration mitochondriale comme méthode principale de métabolisme étaient corrélées à un plus grand encombrement que celles utilisant principalement la glycolyse. Ces résultats montrent un lien entre activité métabolique et encombrement, qu'il serait intéressant de poursuivre.

Nous avons ensuite étudié le mécanisme de séparation de phase liquide-liquide dans la cellule, qui entraine l'apparition de sous-compartiments sans membrane. Nous nous sommes concentrés sur deux types de ces sous-compartiments : les granules de stress et les *P-bodies*. Malgré le fait que cette dernière étude est majoritairement issue de résultats préliminaires, elle suggère que la pression induite par la croissance ne déclenche pas l'apparition de ces granules de stress, mais semble concentrer plus fortement certaines protéines des *P-bodies*. La délétion de certaines de ces protéines dans les *P-bodies* semble quant à elle montrer que la croissance sous confinement est perturbée lorsque ces structures sont absentes, suggérant un rôle adaptatif.

Il est donc nécessaire de terminer l'étude de la séparation de phase des granules de stress et des *P-bodies* afin de comprendre leur rôle exact, mais aussi d'étudier d'autre compartiments sans membrane afin de comprendre l'impact de l'encombrement sur ce problème, et comment ceux-ci pourraient être reliés à la réponse sous pression.

6.2 Perspective générale

Au cours des différents chapitres de ce manuscrit, nous avons évoqué les différentes perspectives spécifiques des différents points soulevés au cours de nos études. Nous allons maintenant évoquer une perspective plus générale, qui est très vite apparue pendant ces travaux de thèse, et qui a donc commencé à être développée : l'universalité de l'impact du confinement sur la croissance de différents organismes.

6.2.1 Universalité du phénomène ?

Nous avons montré dans le chapitre 3 que la diminution de la croissance sous confinement est reliée à l'encombrement des cellules. Or, l'encombrement des cellules est un phénomène biophy-

sique, il est présent chez tous les organismes, et ses effets pourraient être conservés.

Il apparait donc que vérifier que l'on retrouve chez d'autres organismes cette diminution de la croissance, associée à une augmentation de l'encombrement, en fonction de la pression induite par la croissance. Si nous regardons dans la littérature, nous pouvons retrouver certains résultat qui confirment que la pression induite par la croissance apparait lorsque les cellules sont confinées : chez des cellules mammifères (CT26) [2] ou dans la bactéries *E.coli* [109]

Cependant, la gamme de pression que différents organismes peuvent développer est très différente de celles des levures. Nous avons en effet vu que la levure *S. cerevisiae* pouvait développer des pressions allant jusqu'au mégapascal. Or, pour les cellules mammifères, la pression développée est plutôt de l'ordre de quelques kilopascal[2] et quelques dizaines pour les bactéries[109, 25]. De plus les temps de division sont très différents selon les types cellulaires. En effet, si une bactérie comme *E. coli* se divise toutes les 20 minutes environ dans des conditions optimales, les levures se divisent plutôt toutes les 2 heures et, et toutes les 24 h pour les cellules mammifères.

Ainsi, ces différents organismes ont chacun des caractéristiques différentes, ce qui nous a donc obligé à développer des designs de puces microfluidiques spécifiques à chacun d'entre eux. La tailles des cellules, en particulier, a demandé une adaptation de la taille des chambres.

Nous avons donc développé des puces de dimensions plus petites afin de pouvoir accueillir les bactéries, qui peuvent avoir des dimensions sub-micrométriques (Fig.(6.1.b). Ceci a été réalisé grâce à l'utilisation d'un "stepper", machine permettant une photolithographie plus résolue (cf. Méthode). Ainsi, les puces sont réduites de moitié en taille (25 μm de longueur 15μm de largeur et 2μm d'épaisseur) avec des nano-canaux de longueur 30μm, de largeur de 200 à 400nm, et d'épaisseur 400nm. Ceci dit, les bactéries ne développent pas assez de pression pour fermer la pince des chambres, qui est plus dure à fermer également à cause d'une plus faible déformabilité pour des épaisseurs plus petites, ce qui peut limiter la mesure de la pression. Pour l'instant, ceci semble résolu par l'utilisation d'un PDMS plus mou. Ceci dit, une autre méthode consisterait à placer une membrane au-dessus du conduit d'arrivée des cellules qui pourrait être déformée sous pression. J'ai durant ma thèse développée intégralement ce type de puce, qui sont utilisées en collaboration avec l'Institut Pasteur, dans le cadre de la thèse de Laure Le Blanc.

Le problème s'est avéré plus compliqué pour les cellules mammifères. Tout d'abord, des tests ont été réalisés dans des chambres similaires à celles des levures. Cependant, après fabrication des puces et remplissage de celles-ci, nous nous sommes aperçus que les cellules ne poussaient pas. En effet les cellules mammifères sont plus sensibles à leurs conditions de culture, il est particulièrement important qu'elle soit en contact avec d'autre cellules. Ainsi, les introduire individuellement ne semble pas être une technique adéquate, et c'est pourquoi nous avons décidé de développer un dispositif permettant de charger des assemblages multicellulaires, des sphères, dans lesquels les cellules sont naturellement en contant. Les dimensions de ces sphéroïdes sont de l'ordre de la centaine de micromètre, ce qui rend impossible l'utilisation de nos dispositifs. Nous avons ainsi utilisé un autre dispositif, avec une technologie développée dans l'équipe MILE que nous appelons des "tigettes"(6.1.c). J'ai participé au design de base des chambres, très similaire à celui des puces de levures, et qui permet, avec l'utilisation de tigettes, de confiner un sphéroïde. L'utilisation de ce dispositif, ainsi que l'étude du confinement de cellules mammaifères, est réalisé dans le cadre de la thèse de Tiphaine Matéo, au sein de notre équipe.

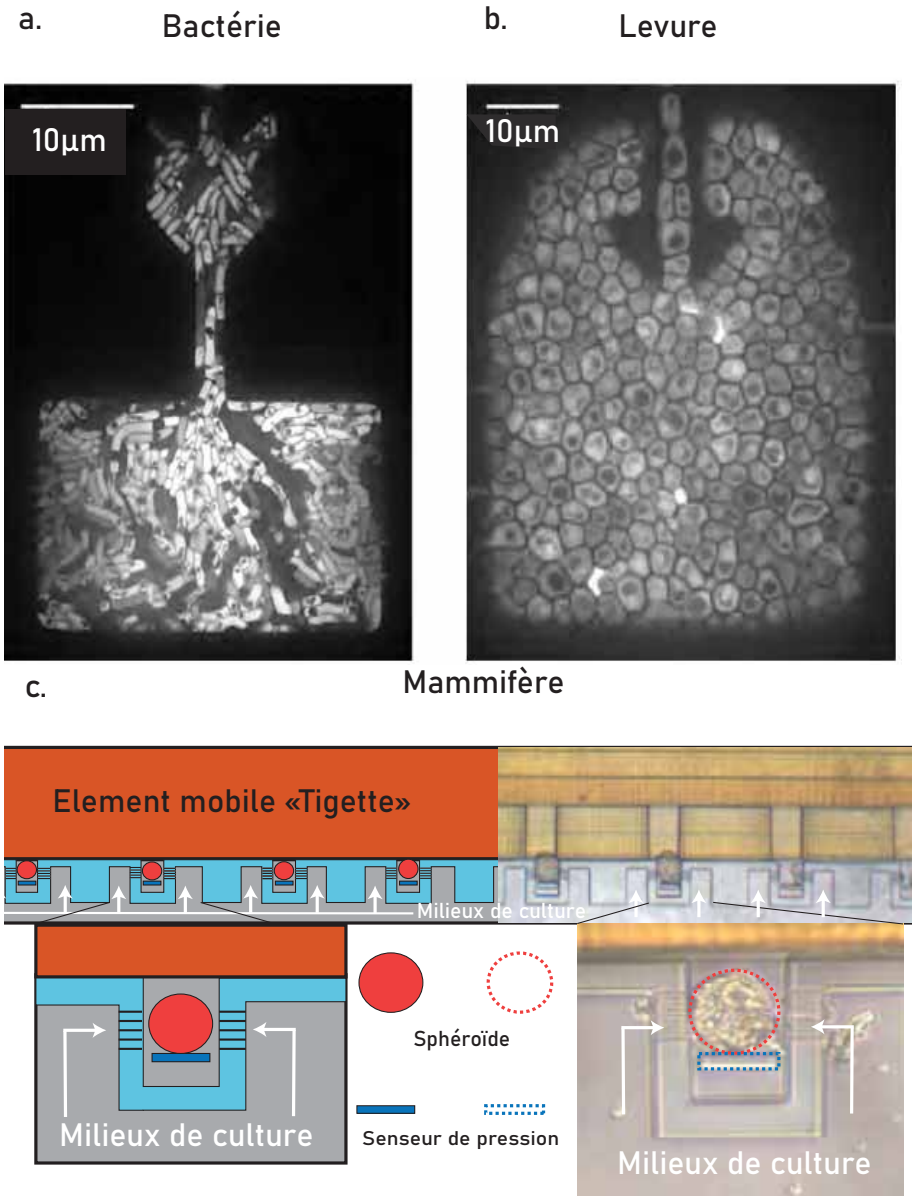


FIGURE 6.1 – Chambre microfluidique "SC" contenant des *S. cerevisiae* dont le cytoplasme a été marqué en fluorescence. b. Chambre microfluidique adaptée au bactérie avec des *E. coli* dont le cytoplasme a été marqué en fluorescence c. Principe des puces utilisée et de la méthode pour la mesure de la pression dans le cas de sphéroïde de cellule mammifère

Nous avons utilisé ces dispositifs et des résultats de notre groupe[99] pour regrouper différentes courbes de pression de croissance chez différents organismes. Comme précisé précédemment, les temps de croissance et la pression développée sont très différents entre les différents organismes pour que les courbes puissent être comparées directement. La compréhension des mécanismes physiques et biologiques chez la levure nous permet de dégager un modèle simple de croissance sous pression, et de montrer que la pression de croissance peut suivre une loi logarithmique $P(t) = P_0 \ln(1 + t/\tau_0)$, avec τ_0 un temps caractéristique correspondant globalement au temps de division de l'organisme, et une pression caractéristique P_0 qui serait la pression atteinte lors de ce temps τ_0, pression qui serait reliée à la pression de turgescence de l'organisme. En ajustant chaque courbe par ce modèle, nous pouvons extraire ces paramètres, et renormaliser les courbes de pression de croissance (Fig.6.2).

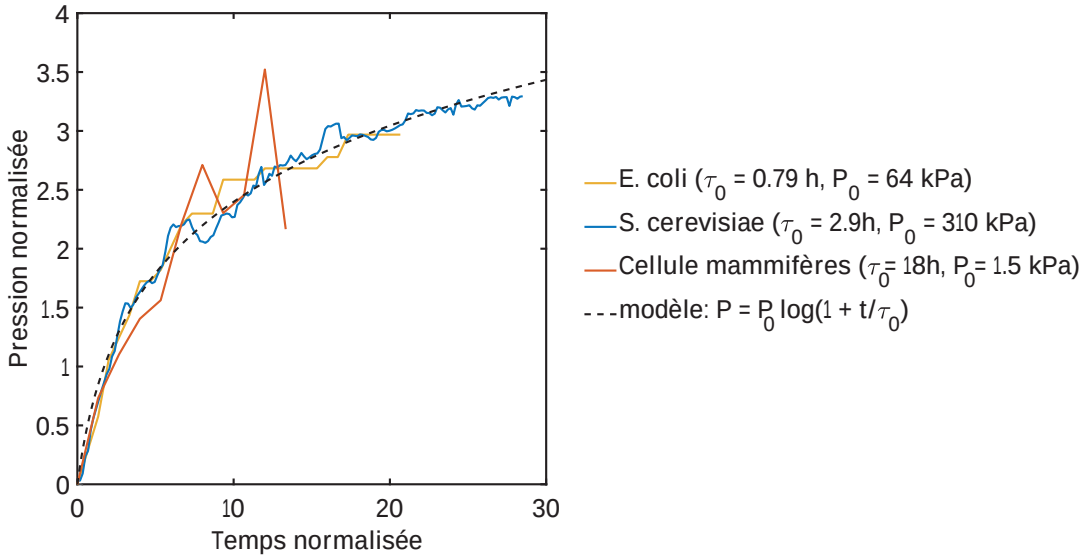


FIGURE 6.2 – Courbe de la pression de croissance en fonction du temps pour les levures, les cellules mammifère et les bactéries. Les données pour les cellules mammifère proviennent de l'article « Rizzuti et al » [99] et les données des bactéries proviennent d'une collaboration avec Laure Le Blanc, doctorante à l'Institut Pasteur, à partir du dispositif pour les bactéries que j'ai développé. Les données sont renormalisés en temps par un temps de division caractéristique et en pression par une pression caractéristique, et montrent que la dynamique de la pression de croissance semble être la même chez différents organismes.

Nous remarquons que les courbes se superposent remarquablement bien, suggérant une dynamique de pression de croissance similaire pour ces différents organismes, qui pourrait avoir pour origine les mêmes mécanismes que ceux présentés chez la levure.

Pour conclure ici, il serait donc particulièrement intéressant d'utiliser les différentes méthodes présentées dans ce manuscrit afin d'étudier l'origine de cette pression de croissance chez ces autres organismes, et de mesurer si l'impact de l'encombrement amène à des conclusions similaires.

6.3 Conclusion finale

Pour conclure ce manuscrit, nous avons vu dans le cadre de l'étude de la levure *S. cerevisiae* que les contraintes mécanique dues au confinement entrainaient une diminution de la croissance. Cette diminution est causée par la diminution du taux de production de protéines, causée par une augmentation de l'encombrement. Comme ce phénomène semble d'origine biophysique, nous pouvons nous attendre à le retrouver dans d'autre organismes.

Notre étude aura donc apporté une meilleure compréhension du phénomène de la croissance sous confinement, et aura surtout montré l'importance de l'encombrement dans les cellules au niveau des réactions prenant place à l'intérieur des cellules.

Cette meilleure compréhension amènera éventuellement à la remise en question de certains test *in vitro* qui ne représente pas la réalité *in vivo*, car négligeant les aspects mécaniques de l'environnement autour des cellules (exemple : les tests de drogue dans des boîtes de Petri). Une prise en compte plus systématique de l'encombrement dans la détermination des taux de réactions cellulaire semble également être importante : ce paramètre biophysique, au cœur de toutes les réactions, semble être un élément clé de la réponse à la compression.

Chapitre 7

Matériel et méthodes

7.1 Principe des dispositifs microfluidique

Les puces micro-fluidiques utilisées lors de cette étude sont réalisées en PDMS (Polydimethylsiloxane) et collées sur une lamelle de verre (60mm x 30mm pour 170 μm d'épaisseur). Les cellules sont chargées dans la puce et observées au microscope (20x, 40x ou 63x). Toutes les puces sont réalisées de façon à confiner les cellules tout en les maintenant alimentée grâce à un système de micro-canaux connectés à une canalisation centrale transportant le milieu de culture.

Design général des moules

Chaque moule est réalisé sur un wafer de 4 pouces et est composé d'une vingtaine de puces. Les puces sont composées de deux côtés, avec chacun 32 chambres.

Self-closing

Les puces dites "Self-Closing" sont les principales puces utilisées dans cette étude. Le design initial a été développé précédemment dans "Delarue et al,2016"[31], et adapté ici. Il consiste en une chambre possédant une pince qui va se fermer sous la pression mécanique développée par les cellules elles-mêmes (Fig.7.1.a). Les cellules sont alimentées par des canaux fins et plus petits que les cellules positionnées sur les côtés de chaque chambre. Certaines modifications du design ont été réalisées durant cette thèse (Fig.7.1.b) :

— Des avancées du canal central ont été faites afin de diminuer la résistance hydraulique des canaux d'alimentation, permettant ainsi un remplissage plus simple et une meilleure alimentation.
— Les moules initiaux ne possédaient qu'un seul design rendant la production lente, de nouveaux moules ont donc été réalisés afin d'avoir jusqu'à une dizaine de puces réalisables par jours.
— Le rajout d'une chambre contrôle sans pince a été fait afin d'avoir un contrôle sans pression (car sans confinement possible) sur chaque puce.

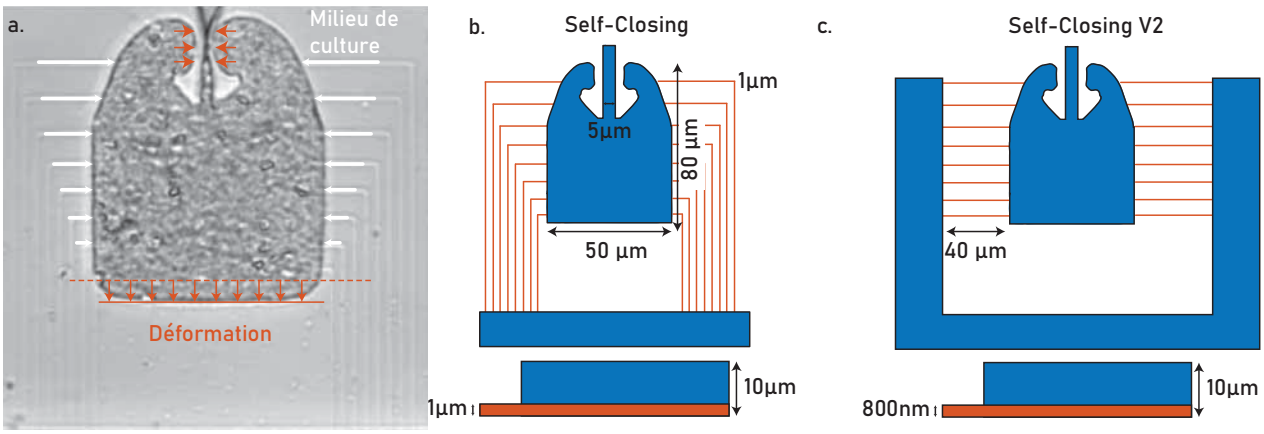


FIGURE 7.1 – a. Image d'une chambre SC avec en orange la déformation de la chambre par les cellules qui permet de fermer la pince, et en blanc l'arrivée du milieu de culture par les canaux d'alimentations. b. Schéma d'une chambre SC avec les dimensions principales. c. Adaptation du design.

Angle

Le second type de chambre, lui aussi développé précédemment [31], est surnommée dispositif "angle". En effet, comme son nom l'indique, les pinces SC ici sont remplacer par des valves qui vont induire une transition de blocage (« jamming »), bloquant ainsi les cellules dans les chambres par l'émergence de chaines de forces dans ce milieu granulaire.

Certaines modifications du design ont aussi été réalisés pour ce type de chambre :

— Les mêmes améliorations que pour les puces SC (avancée du canal central, multiple design sur le moule et rajout de chambre contrôle).
— La taille de la chambre a été adaptée afin d'être similaire en volume à celle des SC et ainsi permettre une meilleure comparaison entre les puces.

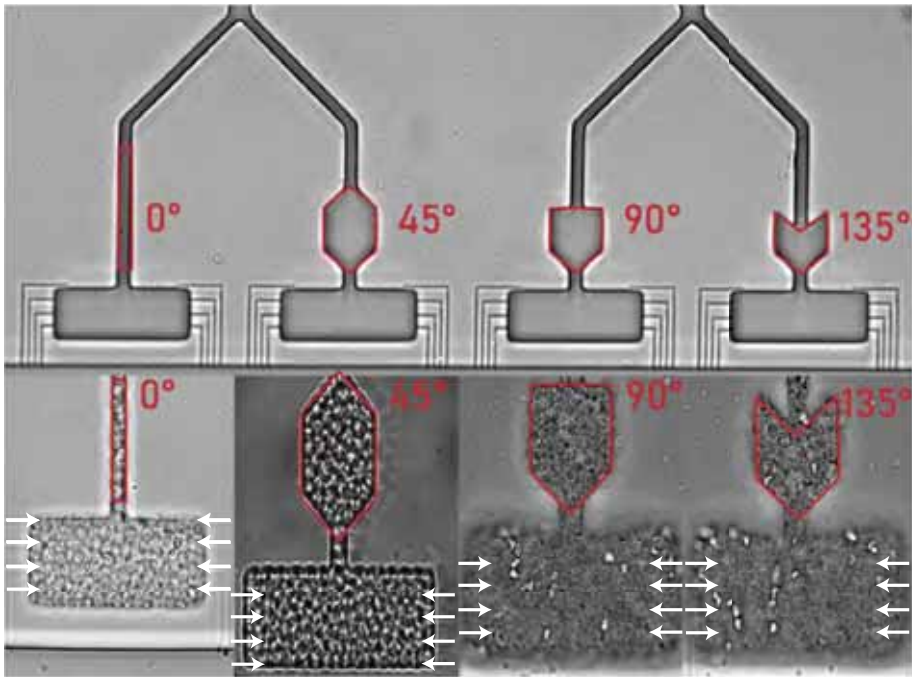


FIGURE 7.2 – a. Image des différentes chambres de type "angle" avec en blanc l'arrivée du milieu de culture par les canaux d'alimentations. b. Schéma des chambre angles avec les dimensions principales.

Pince active

Le dernier design développé précédemment[31], est un design de pince active, que nous appelons "Abate" car provenant d'un développement de cet auteur. Il consiste en deux membranes qui sont mises sous pression afin de fermer le canal d'entrée, limitant ainsi la sortie des cellules. La diminution de la pression permet de relaxer la contrainte, ce que nous avons utilisé dans le chapitre 2.

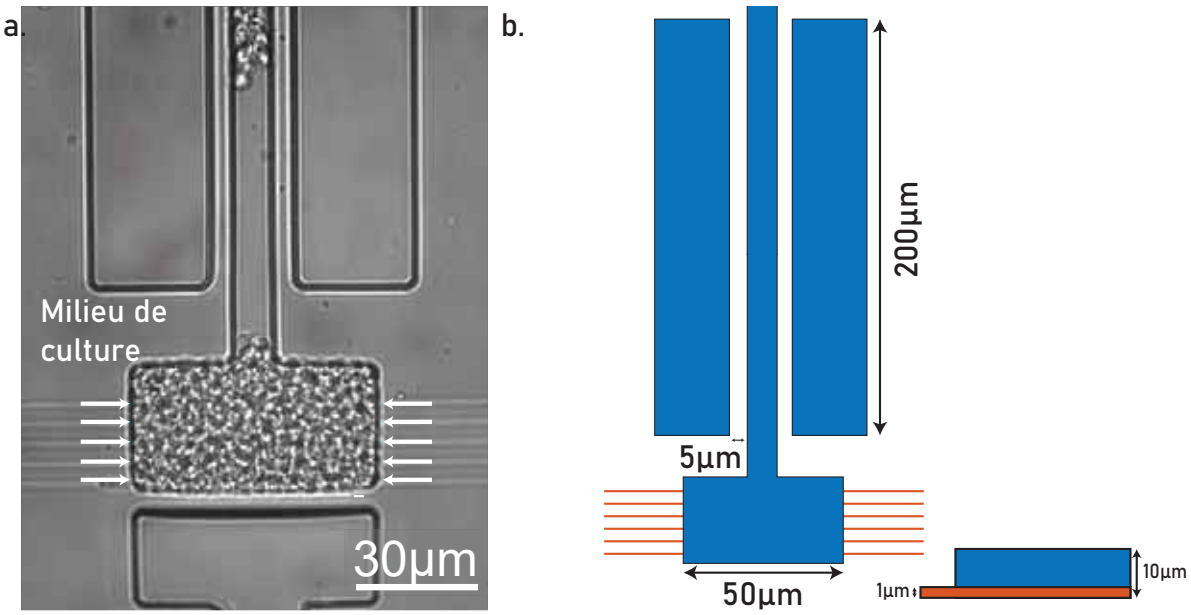


FIGURE 7.3 – a. Image d'une chambre Abate avec en blanc l'arrivée du milieu de culture par les canaux d'alimentations. b. Schéma d'une chambre Abate avec les dimensions principales

Fermeture par le milieu de culture

Le design de fermeture par le milieu de culture est un mélange entre le design SC et le design Abate, puisqu'ici que nous allons utiliser la pression hydrostatique envoyée dans le canal d'alimentation afin de fermer des membranes sur l'entrée des cellules. Ce design a passé l'étape de preuve de concept mais nécessite encore du développement particulièrement au niveau du collage PDMS/verre et au niveau de la longueur des canaux d'alimentation.

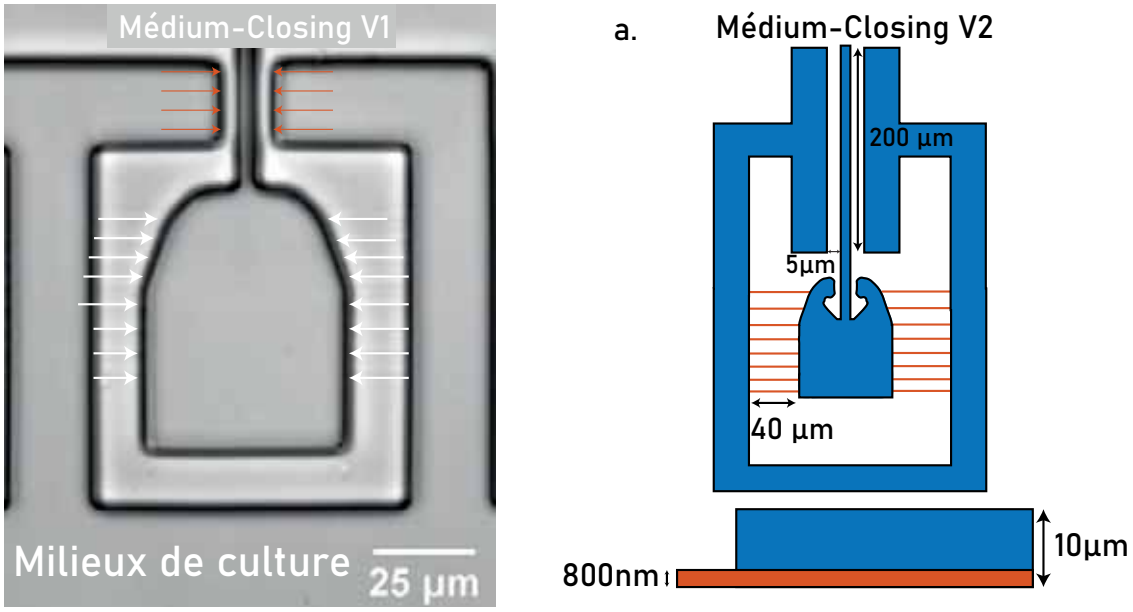


FIGURE 7.4 – a. Image d'une chambre de fermeture par le milieu de culture avec en orange la déformation de la chambre par le milieu de culture qui permet de fermer la pince et en blanc l'arrivée du milieu de culture par les canaux d'alimentations. b. Schéma d'une chambre de fermeture par le milieu de culture avec les dimensions principales.

Dispositif pour l'étude des bactéries

Le design pour les bactéries est une mise à l'échelle des puces SC. Il a été nécessaire de passer à une technique de photolithographie plus précise qui sera décrite dans la suite, notamment pour réduire la dimension des canaux d'alimentation à une échelle sub-micron, la dimension la plus petite de *E. coli* étant d'environ 500 nm. Comme évoqué dans la conclusion de ce manuscrit, ce design ne permet pas en l'état de confiner les cellules car celles-ci ne développent pas assez de pression de croissance pour déformer et ainsi fermer la pince. Mais il est possible de le combiner à d'autres méthodes pour permettre de confiner les cellules, telles que l'utilisation de chambre angles ou de membrane sur le haut de la chambre (comme des vannes horizontales de type Quake).

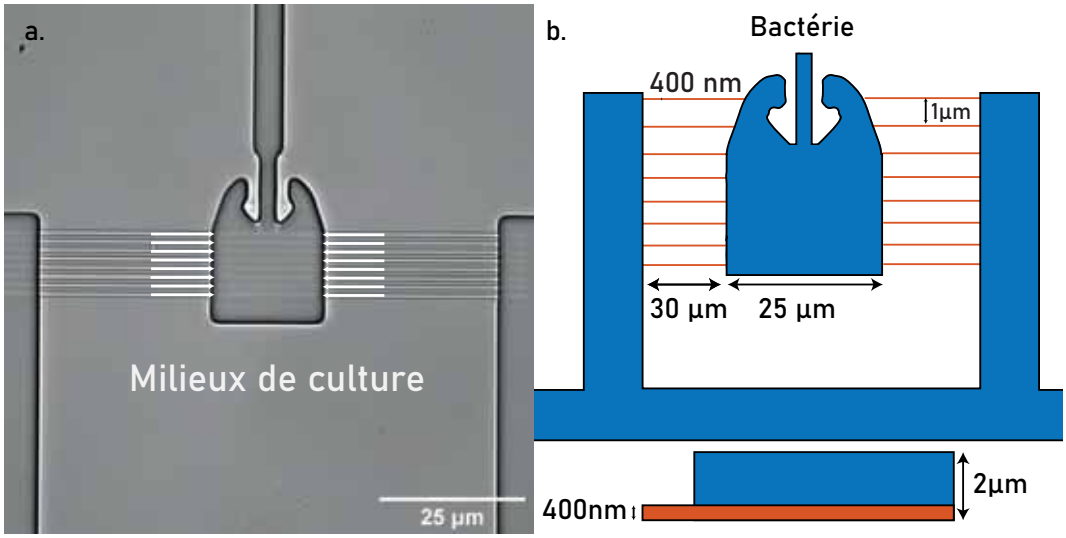


FIGURE 7.5 – a. Image d'une chambre pour les bactéries avec en blanc l'arrivée du milieu de culture par les canaux d'alimentations b. Schéma d'une chambre pour les bactéries avec les dimensions principales

Ibidi

Les puces Ibidi sont des puces commerciales consistant en un simple canal et permettant de réaliser rapidement de la culture sans aucune contrainte. Nous utilisons ce type de puce pour réaliser nos contrôles négatifs.

7.2 Culture cellulaire

Les souches sont conservées dans des cryotubes à -80 degré Celcius. Pour leur utilisation, elles sont étalées sur des gels d'agar contenant du milieu de culture. 24h avant les expériences, une colonie de cellules est resuspendue dans du milieu de culture liquide, et laissée à 30°C jusqu'à utilisation. Juste avant l'expérience, nous vérifions que la solution n'est pas trop concentrée à l'aide d'un spectromètre mesurant la densité optique de la solution, DO, qui est proportionnelle à la concentration en cellule. Le milieu de culture utilisé est du milieu SC (pour Synthetic Complete), composé d'une base azotée (6.7g/L) et d'un mélange d'acides aminées (800mg/L) dans lesquelles nous avons rajouté 2% en masse de glucose, soit 20g par litre. Pour les milieux gélifiés, nous rajoutons également 2% d'agar. Les cellules sont re-striées au maximum toutes les deux semaines (idéalement, chaque semaine), et redécongelées tous les deux-trois mois. Le milieu est préparé par nos soins et est filtré et/ou autoclavé pour éviter toute contamination.

7.3 Souches utilisées

Chapitre 1

Nom	Font génétique	Genotype
40nm-GEMs HTB2-mCherry	BY4741	HTB2 : :HTB2-mCherry-URA3 ; PINO4 : :Pfv-GS-Sapphire-LEU2

Chapitre 2

Nom	Font génétique	Genotype
40nm-GEMs HTB2-mCherry	BY4741	HTB2 : :HTB2-mCherry-URA3 ; PINO4 : :Pfv-GS-Sapphire-LEU2
Cytosolic GFP	W303	ura3 : :pRS306-pHIS3-2xGFP
Nuclear envelop mCherry	W303	NUP1 : :NUP1-mCherry-URA3
20nm-GEMs	W303	ura3 : :PHIS3-AqLumSynth-Sapphire
mRNA particles	W303	GFA1/gfa1 : :GFA1-24PP7 ; PP7-CP-3xYFP : :HIS3
40nm-GEMs *hog1*Δ	BY4742	hog1d : :G418 ; leu2 : :PINO4-PfV-GS-Sapphire) -LEU2 ; pADH2-mCherry(URA)
Nucléole-rouge Noyau-vert	BY4741	Htb2–mNeogreen : :His3 Nop4–mScarlet : :His3

Chapitre 3

Nom	Font génétique	Genotype
40nm-GEMs HTB2-mCherry	BY4741	HTB2 : :HTB2-mCherry-URA3 ; PINO4 : :Pfv-GS-Sapphire-LEU2
P_{ADH2}-*mCherry*	BY4741	ura3Δ0 : :pADH2-mCherry-URA3 ; pINO4 : :Pfv-GS-Sapphire-LEU2
P_{ADH2}-*mCherry hog1*Δ	BY4742	hog1Δ : :G418 ; pADH2-mCherry(URA)

Chapitre 4

Nom	Font génétique	Genotype
40nm-GEMs HTB2-mCherry	BY4741	HTB2 : :HTB2-mCherry-URA3 ; PINO4 : :Pfv-GS-Sapphire-LEU2
Dcp1-RFP	BY4741	Dcp1-Ruby-C1 (pINO4 : :pINO4-Pfv-Sapphire-LEU2)
Dcp2-RFP	BY4741	Dcp2-Ruby-C2 (pINO4 : :pINO4-Pfv-Sapphire-LEU2)
Dcp3-RFP	BY4741	Edc3-Ruby-C3 (pINO4 : :pINO4-Pfv-Sapphire-LEU2)
Ded1-RFP	BY4741	Ded1-Ruby-C1 (pINO4 : :pINO4-Pfv-Sapphire-LEU2)
Pab1-RFP	BY4741	Pab1-Scarlet-C1 (pINO4 : :pINO4-Pfv-Sapphire-LEU2)
Pat1-ko Dcp2-RFP	BY4741	Pat1Δ : : ScUra3 Dcp2-mScarlet : :His3
Edc3-ko Dcp2-RFP	BY4741	Edc3Δ : :hph Dcp2-mScarlet : :His3
Pat1-koEdc3-ko Dcp2-RFP	BY4741	Edc3Δ : :kan pat1Δ : :ScUra3 Dcp2-mScarlet : :His3

7.4 Fabrication salle blanche

Nous allons décrire l'ensemble des protocoles réalisés dans la salle blanche du LAAS-CNRS qui nous ont permis de développer l'ensemble des moules servant à la création des puces en PDMS. L'ensemble de ces protocoles ont été développés par nous-même, avec l'aide des ingénieurs de la-dite salle blanche.

Moule classique

Dans cette partie nous allons décrire le protocole qui nous a permis de fabriquer la majorité des moules pour nos puces en PDMS. Ces moules sont composés de deux niveaux de résine époxy SU8 d'une épaisseur de 800nm et de 10µm. Le protocole est le suivant :

1. Nettoyage et activation d'un substrat (un "wafer") 4 pouces en silicium à l'aide d'un plasma 5 min.

2. Dépôt d'une première couche de résines (SU8 2000.5) sur tournette (vitesse 3000 rpm, accélération 3000 rpm/s et pendant 30 sec). Le dépôt est suivi immédiatement d'un recuit de 60 sec à 175°C.

3. Réalisation de la photolithographie : le wafer recouvert de résine est placé dans une machine permettant une insolation UV (MA6-Gen4), et exposé aux UV avec une puissance de90mJ/cm^2. Nous réalisons rapidement un nouveau recuit appelé PEB (post exposition bake), lui aussi pendant 60 seconde à 175°C.

4. Après le PEB, le wafer avec la résine exposée est plongé dans le développeur SU-8, puis laissé pendant une minute. Le design est alors vérifié au microscope.

5. Dépôt d'une deuxième couche de résine (SU8 3005) sur tournette (vitesse 750 rpm, accélération 3000 rpm/s et pendant 30 sec). Le dépôt est suivi d'un recuit de 180 sec à 95°C.

6. Réalisation de la photolithographie, le wafer recouvert de résine est placée dans la machine (MA6-Gen4) et exposé aux UV avec une puissance de 180mJ/cm^2. Nous réalisons rapidement un PEB pendant 180 sec à 95° C.

7. Après le PEB, le wafer est développé pendant trois minutes.

Pour terminer, le design est vérifié au microscope. Si les designs et tout particulièrement les nano-canaux et l'entrée des chambres ont un aspect correct, le wafer est placé sur une plaque chauffante afin de réaliser un hard bake (200° C pendant 1 min avec une montée et une descente en température avec une pente de 5 degrés par minute) ; sinon le wafer repart pour un bain de développeur tant que les designs ne sont pas correctement réalisés.

La caractérisation finale se fait au travers d'une première étape de mesure d'épaisseur à l'aide d'une profilomètre mécanique. Puis, afin de vérifier l'aspect et les dimensions du design, nous utilisons un microscope électronique à balayage (MEB) afin de prendre les l'images les plus précises possibles.

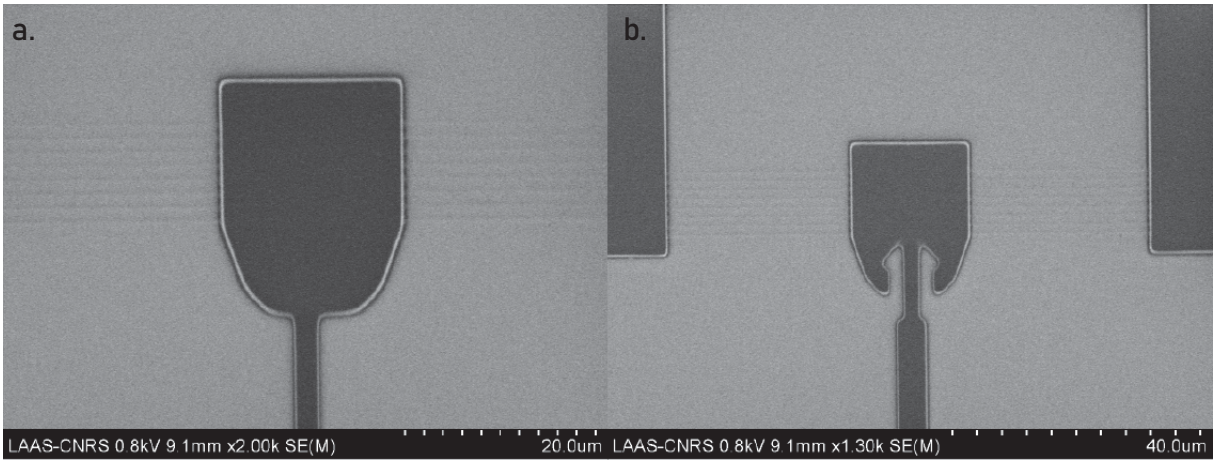


FIGURE 7.6 – a. Image prise au MEB des puces bactéries a. Chambre sans pince b. Chambre avec pince.

Après la caractérisation et avant de sortir le wafer de la salle blanche, le wafer est silanisé à l'aide de la machine SPD (double de dépôt de SiO2 et FDTS), ce qui rendra le wafer ainsi que les structures réalisées hydrophobe et limitera l'accroche du PDMS sur cet ensemble lors du moulage.

Moule en Film sec

Le principe du moule en « Dry film » (film sec) consiste à remplacer la résine SU8 par du dry-film, qui est un film composé de résine époxy permettant le dépôt d'épaisseur précise. Le dry film existe en certaines épaisseurs contrôlées. L'épaisseur la plus fine dont nous disposons est de $5\mu m$, ce qui n'est pas compatible avec notre premier niveau très fin, mais compatible avec le second.

La première différence avec de la Su8 est qu'il est nécessaire de faire un dépôt de promoteur d'adhérence entre la première couche de DF et le wafer.

Ensuite, le film de DF est déposé sur le wafer par lamination.

Le premier niveau est ensuite insolé, puis subit un PEB, avant d'être développé dans de la cyclohexanone. Pour les couches supérieures, le principe est similaire sans le promoteur d'adhérence et en adaptant les paramètres à l'épaisseur souhaité.

Moule réalisé en E-beam

L'electron-beam, ou E-beam (pour faisceau d'électrons), est une technique de photolithographie qui, au lieu d'utiliser des rayons UV pour durcir la résine, utilise un faisceau d'électron énergétique permettant d'obtenir une longueur d'onde de quelques dizaines de nanomètres (au lieu de typiquement 200 nm en UV), permettant une large augmentation de la résolution. Nous avons utilisé cette technique pour une obtenir première version des canaux d'alimentation du dispositif de bactéries. Cela reste cependant une méthode couteuse et bas-débit, qui ne permet pas de fabriquer beaucoup de design sur le même wafer. C'est pourquoi la méthode suivante lui aura été préféré.

Moule réalisés au Stepper

La photolithographie par Stepper fonctionne comme la photolithographie classique, à l'exception prêt qu'elle utilise des lentilles afin de focaliser le rayonnement de la lampe à UV sur la résine, permettant ainsi de réaliser des designs beaucoup plus fins que la méthode classique à longueur d'onde similaire, nous rapprochant de la résolution théorique limitée par la longueur d'onde (200 nm), au lieu d'être limiter par la diffraction des rayons au passage du masque.

Le protocole de fabrication est le suivant :

1. Plasma de nettoyage et d'activation
2. Dépôt d'une couche de BARC à l'aide de la tournette, suivi d'un recuit d'une minute à 200°C. Ainsi Dépôt d'une couche de ECI à l'aide de la tournette, suivi d'un recuit d'une minute à 105 °C
3. Exposition au Stepper (préalablement calibré), dose : $700 J/m^2$
4. PEB et développement sur l'EVG 120 (automate), programme ECI 1,1μm CD. Le tout est suivi d'une vérification de la résolution au microscope, d'une mesure de l'épaisseur au profilomètre, et d'une mesure de la largeur au MEB.
5. Gravure plasma combinée à un nettoyage à l'acétone et à un plasma de nettoyage, suivie d'une nouvelle étape de vérification des épaisseurs et largeurs.
6. Dépôt du deuxième niveau à base d'un mélange de SU8 (2 :1 2000.5 / 3005) à l'aide de la tournette (1000rpm, 1000 rpm/s 30 s), puis d'un recuit de 3 min à 95 °C
7. Une nouvelle étape de photolithographie au stepper avec une dose de 2200 J/m^2
8. Comme précédemment, un PEB de 3 min à 95 ° C suivi d'une étape de développement dans du SU8-develloper pendant 3 min et d' un rinçage dans de l'isopropanol. Nouvelle étape de vérification suivie d'un Hard-bake sur plaque chauffante SU8, 125 °C pendant 2 min avec une rampe de pente +/- 5 degré.
9. Dernière vérification et prise d'image avant un dépôt de silane (FDTS 5min (SiO2 5 min)).

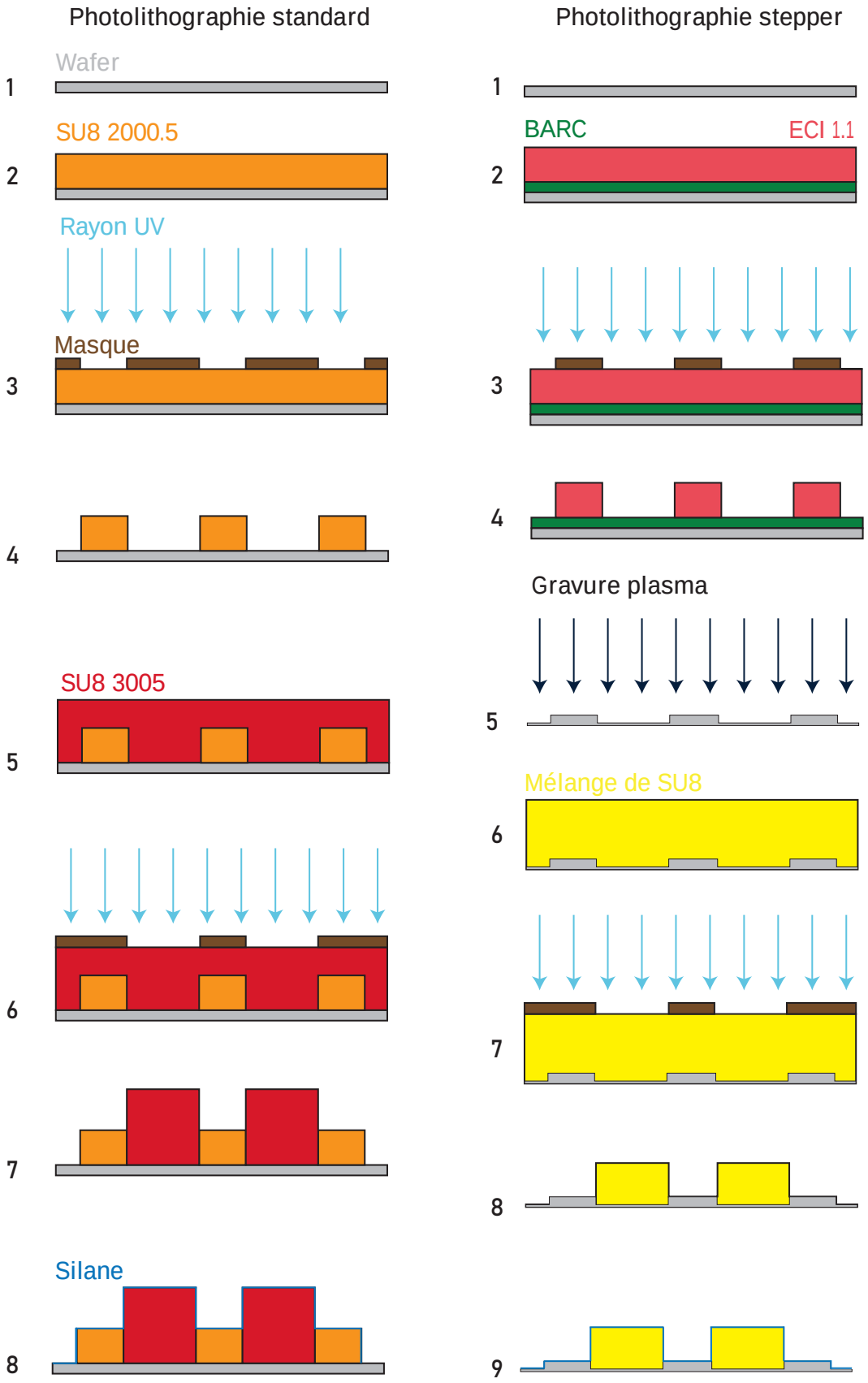


FIGURE 7.7 – Schéma de fabrication en salle blanche. a. Méthode de photolithographie classique de puces sur deux niveaux à l'aide de résine SU8. b. Méthode de photolithographie avec le stepper avec un niveau graver dans le wafer et un niveau de résine SU8.

7.5 Fabrication Salle bio

Dans cette partie, nous allons décrire la fabrication des puces une fois la moule sortie de salle blanche.

Puces en PDMS classique

La première étape consiste en la préparation du PDMS. Pour cela, un mélange base/agent réticulant est réalisé avec un ratio de 10 : 1 en masse. La quantité de mélange préparée est d'environ 2 gramme par puces.

Une fois les deux éléments versés dans un pot, ils sont mélangés fortement ce qui induit la formation de bulles, rendant l'ensemble opaque. Le mélange sera ensuite placé dans une cloche à vide jusqu'à que toutes les bulles disparaissent (environ 15 min par tranche de 10 grammes). Puis :

1. Le mélange sans bulle est coulé sur le moule délicatement afin d'éviter l'apparition de nouvelle bulle.

2. Le moule est ensuite placé dans une étuve à 60 °C une nuit complète afin de réticuler.

3. Vient ensuite la préparation des puces en elle-même. Pour cela nous allons découper, à l'aide d'un scalpel, les puces sur le moule recouvert de PDMS, en prenant soin d'éviter d'abimer les designs. Les puces sont coupées de façons à avoir un carré avec environ 5 mm de libre autour des designs.

4. Ensuite, les puces seront trouées à l'aide d'un puncher de diamètre 0.75mm, puis nettoyées à l'isopropanol.

5. La dernière étape correspond au collage à l'aide d'un plasma à oxygène. Les puces sont placées avec les lamelles de verre préalablement nettoyées dans le plasma. Nous utilisons un plasma Diener PICO avec les réglages suivants (20 secondes, puissance maximale et avec une pression partiel d'oxygène de 0.2 mbar). Une fois le plasma réalisé, les puces et les lamelles sont très rapidement mise en contacts. Le collage est correct si un front de collage apparait uniformément. Les puces seront ensuite placées dans l'étuve à 60 °C pendant au moins 5 heures.

De nombreux réglages ont été nécessaires afin d'optimiser le protocole, particulièrement les réglages du plasma qui dépend de nombreux paramètres extérieurs : hygrométrie de la pièce, température ou niveau d'oxygène dans la bouteille de gaz. Le collage étant une étape critique du protocole, il est nécessaire d'être précis pendant sa réalisation, et, si besoin, d'adapter les réglages du plasma.

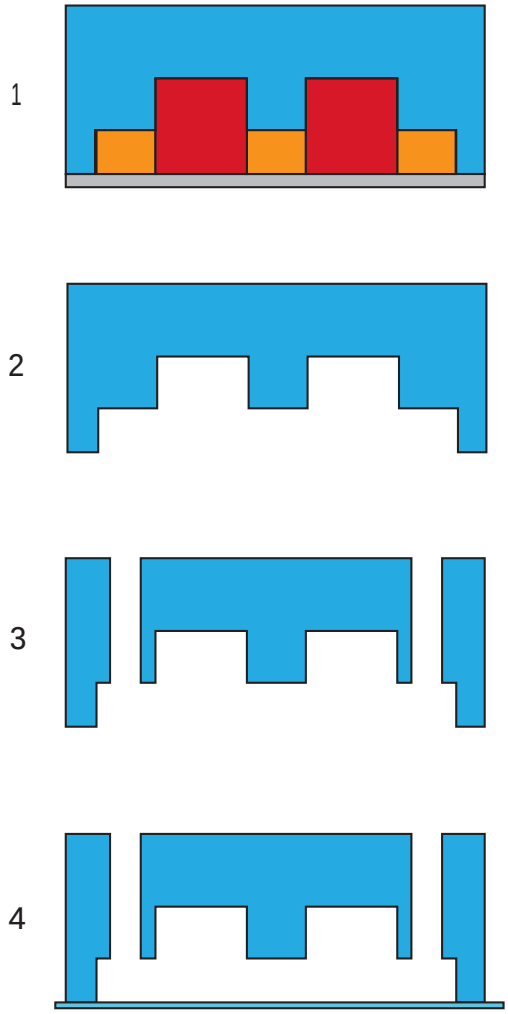


FIGURE 7.8 – Schéma de fabrication en salle bio. a. Fabrication de la puce microfluidique.

7.6 Utilisation des puces sous microscopie

La majorité des expériences ont été réalisées sous un microscope Leica DM IRB microscope avec un objectif 63x.

Le microscope est équipé d'un incubateur afin de réaliser les expériences à 30° C (LeicaTempcontrol37). Ainsi que d'un système de contrôle en z afin de maitriser le focus pendant des expériences de longue durée ou de réaliser des coupes horizontales.

Acquisition en fluorescence

Un spinning-disk (Yokogawa CSU-X1) utilisé avec un laser d'une puissance nominale de 100mW, et une caméra Hamatsu sCMOS Orca flash 4.0 C13440) ont été utilisés pour la majorité des acquisitions. Les filtres ET450/50m(DAPI), ET525/50m(GFP) et ET595/50m(Red), ainsi que le miroir Chroma ZT405/488/561/640rpc complètent le système.

7.7 Protocole d'utilisation des puces microfluidiques

Alimentation dans les puces

Les puces sont alimentées dans les chambres au travers des canaux d'alimentation. Pour pressuriser ceux-ci, nous avons utilisé deux méthodes : des seringues sur lesquelles nous maintenons la pression avec des élastiques ; si cette méthode est simple à mettre en place, elle n'est pas très précise et parfois les élastiques sautent, ce qui implique que les cellules ne sont plus alimentées. La seconde méthode consiste à utiliser un contrôleur de pression Fluigent MFCS, qui permet d'appliquer une pression contrôlée de 1500 mbar dans les canaux, et de maintenir celle-ci constante dans le temps. Cette méthode est plus robuste, mais nécessite plus de matériel et de préparation.

Croissance des cellules sous confinement

Pour réaliser l'expérience de croissance confinée, nous avons utilisé le protocole suivant :

— Nous sélectionnons une puce sans défaut apparent, particulièrement au niveau des canaux d'alimentation.
— Nous découpons des tuyaux flexibles de rayon externe 0.90 mm sur une longueur d'environ 20 cm.
— Nous préparons le système Fluigent MFCS avec du milieu de culture dans des tubes de 1.5 mL branchés à un support de tubes.
— Nous branchons les tuyaux préalablement coupés puis nous faisons couler du liquide dans ceux-ci afin d'en retirer l'air.
— Nous branchons les tuyaux remplis de milieu dans la puce au niveau des entrées.
— Nous préparons une seringue avec les cellules en suspension, que nous branchons à un tuyau qui sera, une fois l'air retiré, branché à la puce.
— Nous plaçons la puce sous le microscope et commençons à remplir la puce (l'ordre de remplissage dépend aussi du design ; dans le cas des puces SC/angle nous commençons par remplir les chambres par les cellules en suspensions avant de faire couler le milieu dans les canaux d'alimentation, afin d'éviter de mettre les cellules en contact avec une bulle d'air Fig.7.7).
— Quand les chambre sont remplie aux 2/3 environ, nous coupons les tuyaux connectés à la seringue puis plaçons un bouchon sur la sortie du milieu, ceci afin de créer un flux qui vient du canal d'alimentation puis remonte par les chambres.
— Pour terminer, nous fermons l'enceinte thermorégulée avant de paramétrer et de lancer l'acquisition.

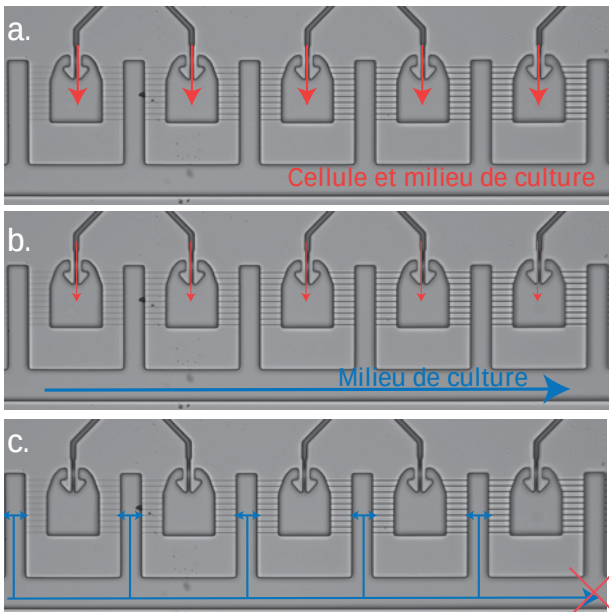


FIGURE 7.9 – a. Première étape du remplissage des puces dans laquelle nous remplissons les chambre avec le milieu contenant les cellules (Flèches rouge). b. Deuxième étape où nous retirons l'air du canal central grâce au milieu de culture. c. Dernière étape durant laquelle la puce est mise sous pression de manière à faire circuler le milieu du canal central aux chambres.

pADH2

Pour l'expérience de déprivation de glucose permettant d'induire le promoteur du gène *ADH2* et notre construction $P_{ADH2} - mCherry$, nous réalisons le protocole précédent sans faire d'acquisition, puis nous réalisons les étapes suivantes. Le milieu de déprivation de glucose utilisé est un milieu SC sans glucose mais supplémenté avec du sorbitol à une concentration similaire à celle du glucose dans le milieu normal afin de ne pas induire un choc osmotique.

— Nous coupons l'alimentation des cellules et retirons le bouchon de la sortie du milieu.
— Nous changeons le tuyau d'alimentation pour en brancher un autre préalablement connecté au réservoir de milieu appauvri et rempli avec celui-ci
— Nous laissons le milieu circuler pendant 5 minutes tout en essuyant les gouttes sortant du canal central.
— Nous rebranchons le bouchon sur la sortie des cellules/
— Nous terminons en relançant l'acquisition.

Relaxation de la contrainte compressive

Les puces Abate utilisées pour les expériences de relaxations ont un autre type de remplissage puisqu'il est nécessaire de remplir d'abord le canal d'alimentation avant de remplir la chambre avec les cellules en suspension. Ensuite le protocole est le suivant :

— Une fois la puce branchée comme dans les protocoles précédents et que la chambre est remplie aux 2/3 de cellules, nous appliquons une pression d'environ 5 bar sur la membrane fermant ainsi la chambre.
— Le bouchon sera quant à lui placé sur l'entrée de cellule afin d'alimenter complètement la chambre
— Après avoir laissé les cellules pousser pendant une nuit, nous allons couper l'alimentation en milieu puis progressivement réduire la pression dans la pince afin d'éviter de faire sortir trop de cellules de la chambre. En diminuant le nombre de cellules, nous diminuons ainsi la compression, dans la limite où si la densité retourne à la densité avant confinement, la

pression est totalement relaxée.
— Nous lançons immédiatement l'acquisition qui aura été paramétrée au préalable puisque que les phénomènes de relaxation sont très rapides (de la seconde à la minute).

Chocs Osmotiques

Pour les chocs osmotique, l'expérience est relativement simple : du milieu de culture dans le quelle nous a rajouté du sorbitol est préparée et placé à 30 °C. Nous mélangeons ensuite les cellules avec ce milieu et les plaçons dans des chambres Ibidi avant de les observer ou d'acquérir des films.

7.8 Analyse d'image

Nous allons revenir sur les méthodes d'analyse d'image que nous avons développé durant cette thèse.

Avant de revenir sur les méthodes spécifiques à chaque expérience, nous avons réalisé un premier traitement d'image similaire pour toutes les expériences.

Les images sont tournées afin d'avoir les chambres à la verticale, puis nous utilisons le plugin "align stack" pour retirer un éventuel décalage en x-y dans les films. Cette étape est particulièrement importante pour les films où l'on mesure la pression à partir de la déformation d'un point fixe dans la chambre. Nous découpons, ensuite les images afin de réduire leur poids avant de les classer selon les conditions expérimentales. L'ensemble de ces étapes est réalisé avec un script FIJI que j'ai développé.

Mesure de la pression

Pour la mesure de pression, nous allons utiliser des programmes Matlab qui vont détecter la paroi de la chambre à chaque temps. Ainsi, en connaissant la position initiale, nous pouvons remonter à la déformation de la chambre par la pression de croissance (Fig.7.8.a).

Une fois la déformation obtenue, nous devons la transformer en pression. Pour cela il est nécessaire de connaitre le coefficient de calibration. Pour cela nous allons choisir une puce où les microcanaux sont effondrés, formant ainsi une impasse (ceci arrive quand les puces sont anciennes, ou lorsque le collage au plasma est trop fort). Nous allons brancher cette impasse sur un contrôleur de pression, et remplir la chambre d'eau. Le PDMS étant perméable à l'air celui-ci va diffuser à travers la puce qui ne sera remplie que d'eau. Une fois la chambre pleine, nous appliquons une rampe de pression et mesurons la déformation. La pression et la déformation étant proportionnelles, une simple régression linéaire nous donnera le coefficient de calibration déformation-pression (Fig.7.8.b).

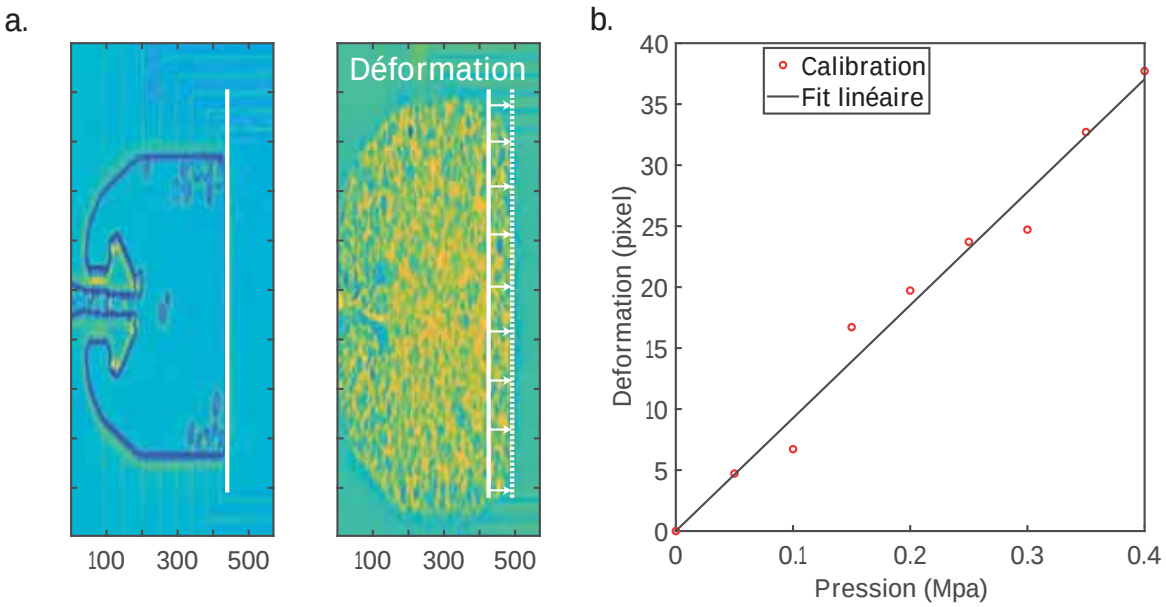


FIGURE 7.10 – a. Détection des bords de la chambre grâce à des scripts Matlab "maison". b. Calibration de la déformation en pixel par rapport à la pression.

Comptage du nombre de cellules

Pour le comptage des cellules, nécessaire à la détermination du taux de division, nous utilisons des cellules avec un noyau marqué en fluorescence (*HT2B-mCherry*). Nous appliquons un filtre gaussien, diminant le bruit, et binarisons l'image sur FIJI. Puis nous détectons les noyaux sur Matlab à l'aide de la fonction "imfindcircle". Cette fonction détecte les cercles à partir d'une transformation de Hough, ce qui fonctionne bien avec nos noyaux(Fig.7.11). Dans le cas d'un signal peu bruité, une autre fonction de Matlab peut être utilisée : bwlabel. Cette fonction détecte les pixels groupés.

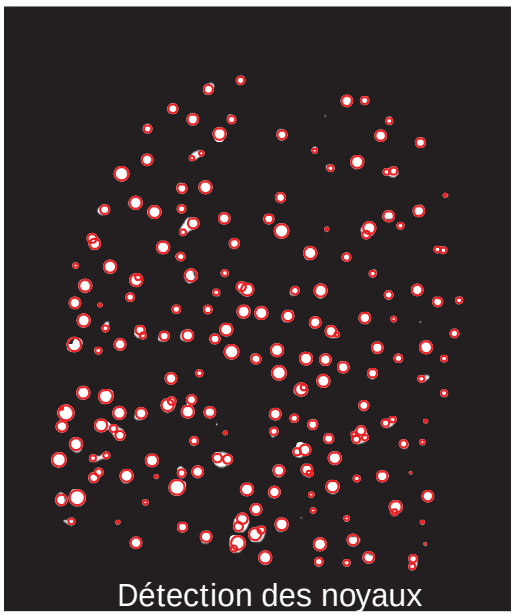


FIGURE 7.11 – Détection des noyaux des cellules à l'aide de script Matlab. Chaque cercle rouge entoure un noyau, comme nous pouvons l'apprécier sur cette image.

Analyse de la fluorescence induite lors de l'expression de $P_{ADH2} - mCherry$

Pour l'analyse de l'évolution de la quantité de fluorescence lors de l'induction de *mCherry* par une déprivation de glucose, nous commençons par noter le centre de chaque cellule dans les chambres, puis nous prenons un cercle, d'environ 1 micron de rayon autour de chacun de ces points, dans lequel nous mesurons la fluorescence. Nous allons ensuite tracer la courbe intensité en fonction du temps pour chaque cellule. Ces courbes seront ensuite ajustées par l'équation quadratique $I = k_p rod(t - to)^2$. Ceci nous permettra d'obtenir un taux de production effectif (combinant transcription, traduction transport, etc.), ainsi qu'un délai pour chacune de ces courbes. Ensuite, ces taux et délais seront binnés en fonction de la pression moyenne expérimentée par les cellules.

Mesure du mouvement des GEMs

Pour les GEMs, comme nous utilisons le plugin MOSAIC [102] pour l'acquisition des trajectoires, en faisant attention de régler les bons paramètres de taille de particules et de diffusion (4 pixel pour la taille, 1 frame de déplacement et 5 px de taille déplacement). L'ensemble des programmes développés pour calculer les MSD et autres paramètres ont été développés par Morgan Delarue, ayant travaillé précédemment sur l'acquisition des GEMs, et ont été peu modifiés pour cette étude[30]

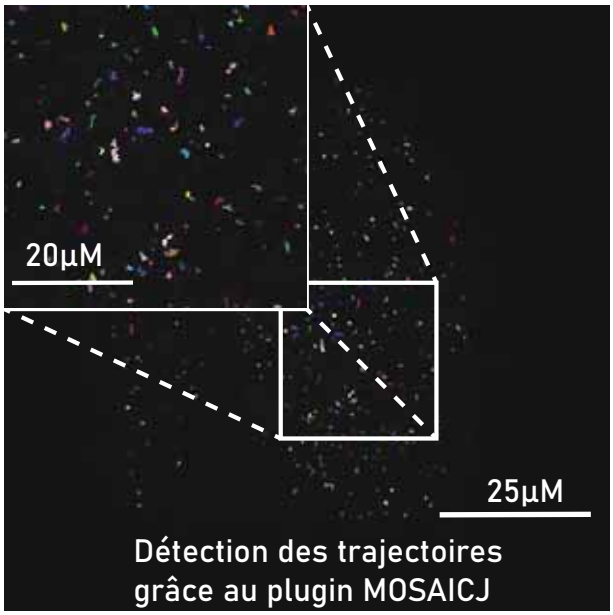


FIGURE 7.12 – Trajectoire des GEMs dans des cellules placées dans une chambre microfluidique à l'aide du plugin MOSAIC.

Mesure de la séparation de phase

Pour la séparation de phase, nous allons commencer par les SUMO-SIM qui sont relativement facile à détecter grâce à leurs grandes tailles. Le protocole est similaire à celui de comptage des noyaux à ceci près que la fonction imfindcircle nous donne plus d'information que le nombre de cercle, puisque que nous extrayons aussi le rayon des cercles.

Pour les P-bodies et les granules de stress, la détection est plus compliquée. Ce travail étant l'un des derniers réalisés durant la thèse, le protocole n'est pas encore complètement stable. Nous prenons les images et réalisons des traitements de l'image tels qu'un filtre gaussien et soustraction du bruit de fond, avant de détecter les puncta grâce à l'outil "3D Object Counter" de FIJI(Fig.7.13).

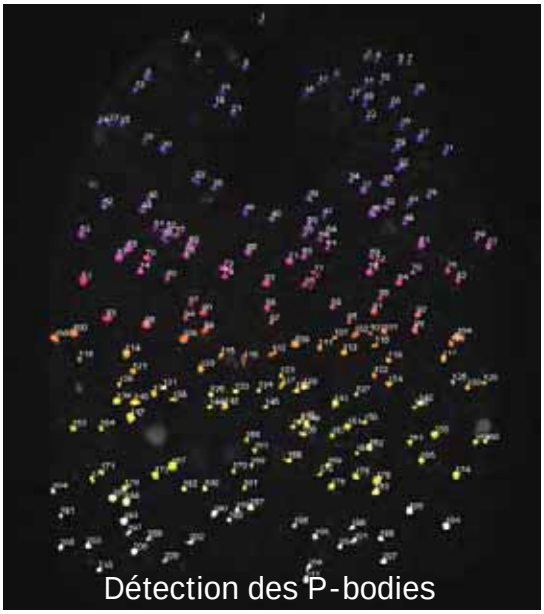


FIGURE 7.13 – Détection des P-bodies à l'aide de l'outils "3D object Counter" de FIJI.

7.9 Simulation de sphères dures

Principe

Le but de la simulation est de réaliser une modélisation d'un bain de sphères dures contenant des particules encombrantes et une particule traceur.

Initialisation

La première étape est de déterminer la taille de la boîte afin de fixer la fraction volumique, ϕ correctement. Pour cela, nous utilisons la relation entre l'encombrement et le rayon des particules :

$$Taille_{boite} = \sqrt[3]{\frac{(N_{ribosomes} * V_{ribosomes} + N_{tracers} * V_{tracers})}{\phi}} \tag{7.1}$$

Une fois la taille de la boite fixée, nous avons développé une fonction qui va diviser cette boite en 27 boites plus petites et placé les particules aléatoirement dans chacune des sous-boîtes.

Nous allons laisser tourner le programme pendant un nombre de pas assez grands pour que les particules se retrouvent dans une organisation aléatoire. Le nombre de pas dépend de l'encombrement et de l'intervalle de temps entre les pas.

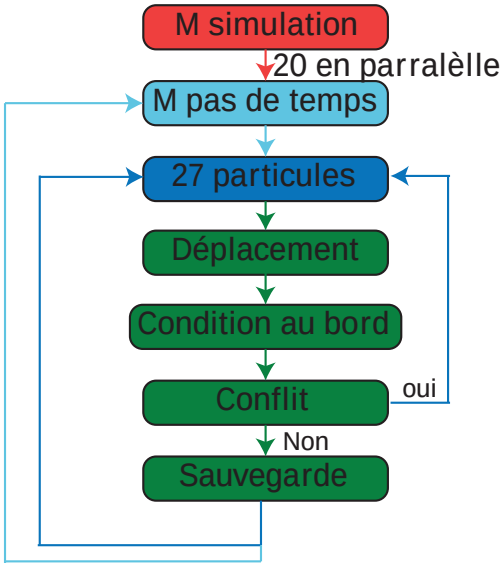


FIGURE 7.14 – Principe des étapes de la simulation

Nous démarrons l'exploitation de la simulation uniquement lorsque la quantité de conflits moyens est stable, ce que nous avons identifié comme le moment où les particules sont bien réparties de manière aléatoire.

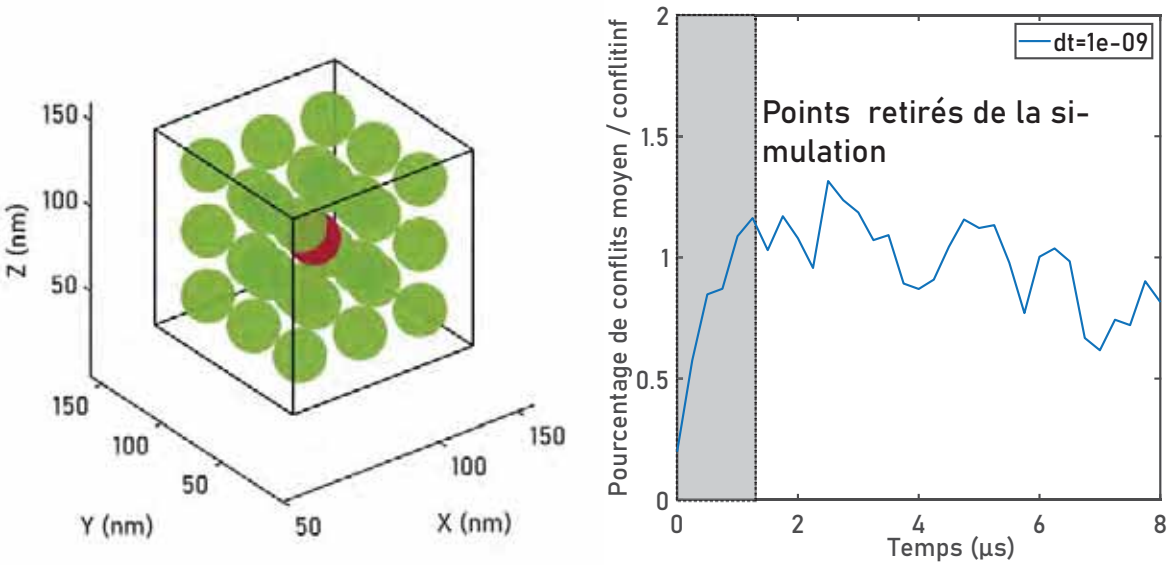


FIGURE 7.15 – a. Initialisation cristalline des particules. b. Sélection des points qui seront retirées de la simulation afin d'avoir une distribution aléatoire.

Déplacement des particules

Le déplacement de chaque particule se fait de façon séquentielle, en démarrant par le traceur puis les encombrants un par un. Nous allons d'abord tirer une nouvelle position dans une gaussienne centrée sur zéro et de variance égale au coefficient de diffusion de la particule qui se déplace dans de l'eau. Une fois le déplacement déterminé, nous vérifions d'abord si la particule sort de la boîte puis s'il y a contact avec une autre particule. Pour limiter le temps de calcul nous vérifions si une particule possède une coordonnée dans chaque dimension autour des coordonnées de notre particule. Si tel est le cas, nous vérifions si les particules se rencontrent. Dans le cas d'un conflit, c'est-à-dire si les deux centres deux particules sont à une distance inférieure à la somme des rayons des particules, la particule en mouvements revient à sa position d'origine. Ces deux tests peuvent sembler redondant mais permettent de détecter plus rapidement la présence des conflits.

Une fois le mouvement accepté ou non, il est enregistré puis la prochaine particule se déplace.

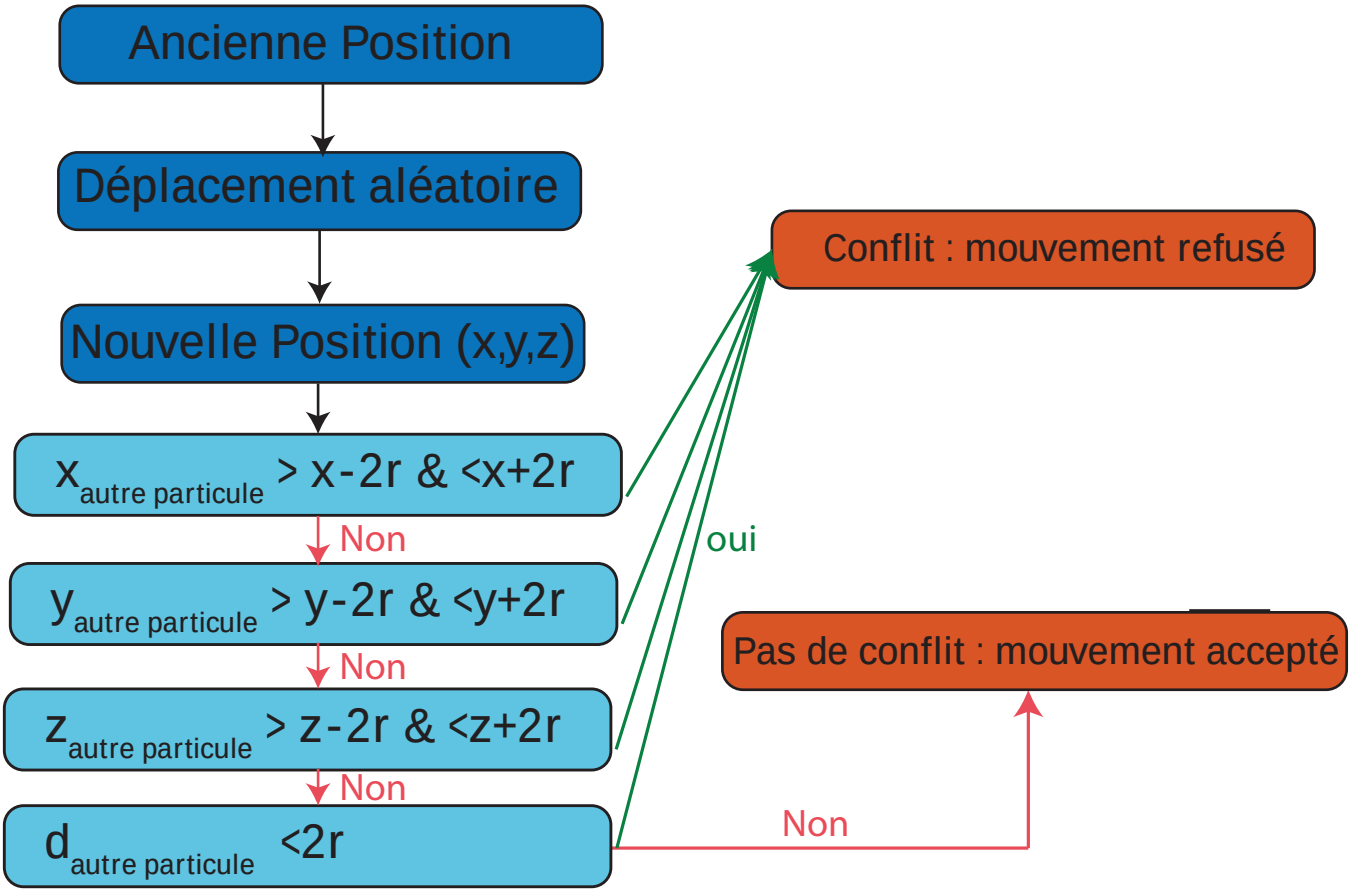


FIGURE 7.16 – Principe des déplacements et la gestion des conflits

Conditions aux bords

Pour les conditions aux bords, nous avons choisie de faire une méthode spécifique où la particule va revenir du côté opposé de la boite (condition aux bords périodique).

Dans le cas où le mouvement d'une particule la fait traverser les parois de la boite, elle va revenir de l'autre côté de la boite et ceci afin de maintenir un encombrement constant dans celle-ci. Cependant nos premiers tests ont montré un problème : il est impossible de faire traverser la particule entièrement sans faire apparaitre un conflit et donc annuler le mouvement. C'est pour cela que nous avons développé un système de particules "fantôme". Celles-ci vont permettre aux particules de partiellement dépasser les bords de la boîte sans pour autant diminuer l'encombrement dans celle-ci.

La particule traceur, quant à elle, se déplace dans un environnement infini, mais ses coordonnées sont repliées dans la boîte périodique pour identifier les conflits.

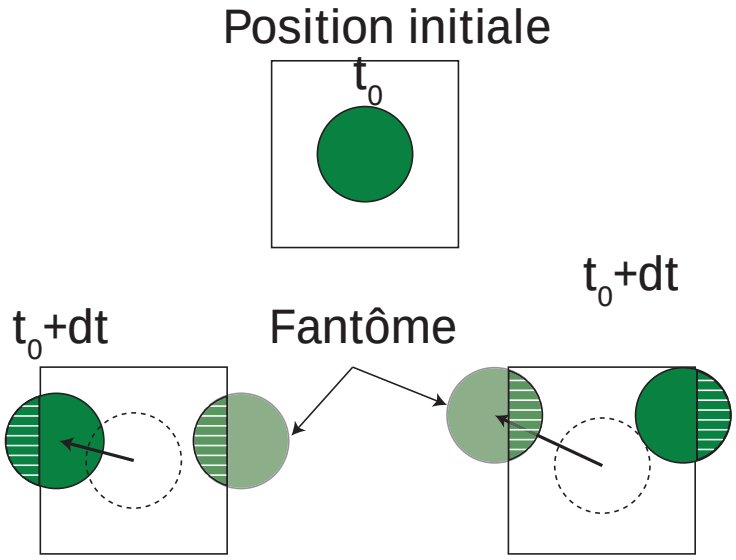


FIGURE 7.17 – Principe des conditions au bord avec l'utilisation de particules fantômes.

Stockage des coordonnées

Pour l'étude des trajectoires des particules, nous sauvegardons les positions des particules de deux façons. La première nommée "Périodique" est la position dans la boîte périodisée permettant la résolution des conflits, et de travailler avec un petit nombre de particules. Dans ce cas, la particule ne quitte pas la boîte, donc ses positions ne servent qu'à avoir de films ou des images dans la simulation.

La seconde façon, que nous utilisons principalement pour le traceur qui lui ne doit pas être limité dans l'espace, va nous donner la trajectoire de la particule "sans limite", et c'est donc sur cette trajectoire que sont faites les diverses analyses, tels que les calculs de MSD ou la probabilité des déplacements.

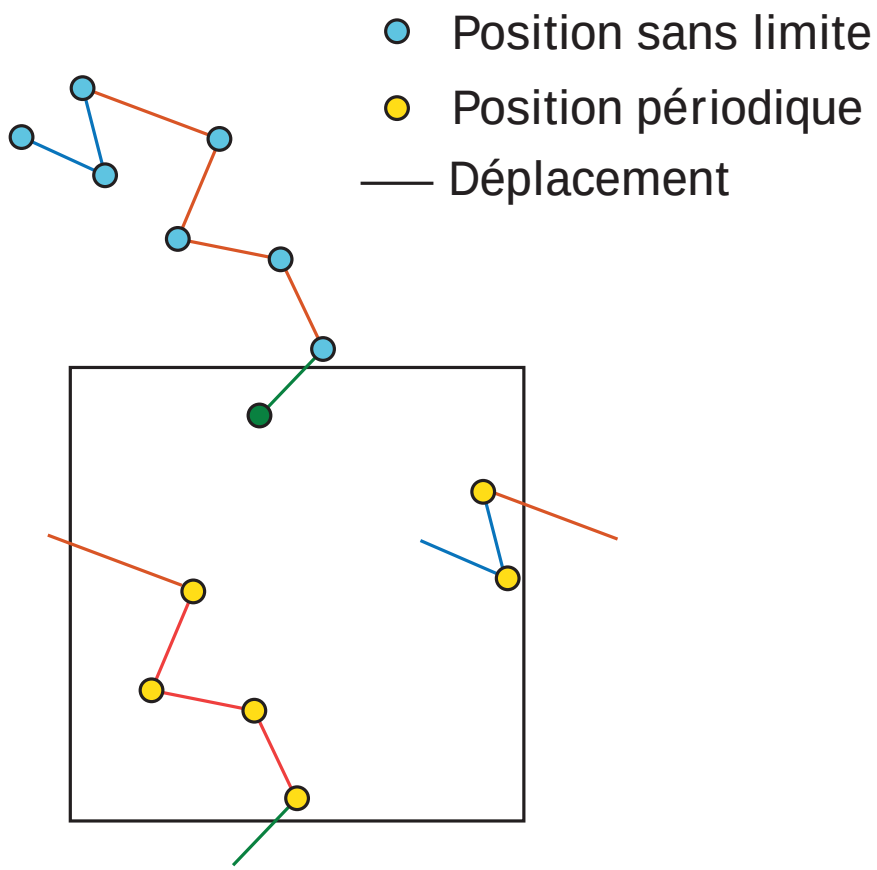


FIGURE 7.18 – Principe du stockage avec en jaune les positions "périodique" et en bleu les positions "sans limite"

Annexe A

Bibliographie

Bibliographie

[1] Jacobus Albertyn, Stefan Hohmann, and Bernard A Prior. Characterization of the osmotic-stress response in saccharomyces cerevisiae : osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Current genetics*, 25(1) :12–18, 1994.

[2] Kévin Alessandri, Bibhu Ranjan Sarangi, Vasily Valérïévitch Gurchenkov, Bidisha Sinha, Tobias Reinhold Kießling, Luc Fetler, Felix Rico, Simon Scheuring, Christophe Lamaze, Anthony Simon, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37) :14843–14848, 2013.

[3] Baptiste Alric, Cécile Formosa-Dague, Etienne Dague, Liam J Holt, and Morgan Delarue. Macromolecular crowding limits growth under pressure. *bioRxiv*, 2021.

[4] Munehiro Asally, Mark Kittisopikul, Pau Rué, Yingjie Du, Zhenxing Hu, Tolga Çağatay, Andra B Robinson, Hongbing Lu, Jordi Garcia-Ojalvo, and Gürol M Süel. Localized cell death focuses mechanical forces during 3d patterning in a biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46) :18891–18896, 2012.

[5] Louis Bachelier. Théorie de la spéculation. In *Annales scientifiques de l'École normale supérieure*, volume 17, pages 21–86, 1900.

[6] Somenath Bakshi, Albert Siryaporn, Mark Goulian, and James C Weisshaar. Superresolution imaging of ribosomes and rna polymerase in live escherichia coli cells. *Molecular microbiology*, 85(1) :21–38, 2012.

[7] Salman F Banani, Allyson M Rice, William B Peeples, Yuan Lin, Saumya Jain, Roy Parker, and Michael K Rosen. Compositional control of phase-separated cellular bodies. *Cell*, 166(3) :651–663, 2016.

[8] Jyotica Batra, Ke Xu, and Huan-Xiang Zhou. Nonadditive effects of mixed crowding on protein stability. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(1) :133–138, 2009.

[9] AG Bengough, C Croser, and J Pritchard. A biophysical analysis of root growth under mechanical stress. In *Plant Roots-From Cells to Systems*, pages 107–116. Springer, 1997.

[10] A. M. Bertholet, T. Delerue, A. M. Millet, M. F. Moulis, C. David, M. Daloyau, L. Arnaunés-Pelloquin, N. Davezac, V. Mils, M. C. Miquel, M. Rojo, and P. Belenguer. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity, 2016.

[11] Arnold J Boersma, Inge S Zuhorn, and Bert Poolman. A sensor for quantification of macromolecular crowding in living cells. *Nature methods*, 12(3) :227–229, 2015.

[12] François-Michel Boisvert, Silvana Van Koningsbruggen, Joaquín Navascués, and Angus I Lamond. The multifunctional nucleolus. *nature.com*, 574, 2007.

[13] Daria Bonazzi, Valentina Lo Schiavo, Silke Machata, Ilyas Djafer-Cherif, Pierre Nivoit, Valeria Manriquez, Hirokazu Tanimoto, Julien Husson, Nelly Henry, Hugues Chaté, et al. Intermittent pili-mediated forces fluidize neisseria meningitidis aggregates promoting vascular colonization. *Cell*, 174(1) :143–155, 2018.

[14] Hans J Bosma, Gerrit Voordouw, Arie De Kok, and Cees Veeger. Self-association of the pyruvate dehydrogenase complex from azotobacter vinelandii in the presence of polyethylene glycol. *FEBS letters*, 120(2) :179–182, 1980.

[15] Stephanie Breuil-Broyer, Patrice Morel, Janice De Almeida-Engler, Vincent Coustham, Ioan Negrutiu, and Christophe Trehin. High-resolution boundary analysis during arabidopsis thaliana flower development. *The Plant Journal*, 38(1) :182–192, 2004.

[16] Jay L Brewster, Tamsen de Valoir, Noelle D Dwyer, Edward Winter, and Michael C Gustin. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259(5102) :1760–1763, 1993.

[17] Robert Brown. Xxvii. a brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *The philosophical magazine*, 4(21) :161–173, 1828.

[18] Nia J Bryant and Tom H Stevens. Vacuole biogenesis in saccharomyces cerevisiae : protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1) :230–247, 1998.

[19] J. Ross Buchan, Denise Muhlrad, and Roy Parker. P bodies promote stress granule assembly in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Cell Biology*, 183(3) :441–455, nov 2008.

[20] J Ross Buchan and Roy Parker. Eukaryotic stress granules : the ins and outs of translation. *Molecular cell*, 36(6) :932–941, 2009.

[21] Stefano Busti, Paola Coccetti, Lilia Alberghina, and Marco Vanoni. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in saccharomyces cerevisiae. *Sensors*, 10(6) :6195–6240, 2010.

[22] Clotilde Cadart, Ewa Zlotek-Zlotkiewicz, Larisa Venkova, Olivier Thouvenin, V Racine, Maël Le Berre, Sylvain Monnier, and Matthieu Piel. Fluorescence exclusion measurement of volume in live cells. *Methods in cell biology*, 139 :103–120, 2017.

[23] NA Chebotareva, BI Kurganov, and NB Livanova. Biochemical effects of molecular crowding. *Biochemistry (Moscow)*, 69(11) :1239, 2004.

[24] Gang Cheng, Janet Tse, Rakesh K Jain, and Lance L Munn. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS one*, 4(2) :e4632, 2009.

[25] Eric K. Chu, Onur Kilic, Hojung Cho, Alex Groisman, and Andre Levchenko. Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli. *Nature Communications*, 9(1) :4087, dec 2018.

[26] B Cichocki and K Hinsen. Dynamic computer simulation of concentrated hard sphere suspensions : I. simulation technique and mean square displacement data. *Physica A : Statistical Mechanics and its Applications*, 166(3) :473–491, 1990.

[27] Brian R Daniels, Byron C Masi, and Denis Wirtz. Probing single-cell micromechanics in vivo : the microrheology of c. elegans developing embryos. *Biophysical journal*, 90(12) :4712–4719, 2006.

[28] IM De Mara on, Pierre-André Marechal, and Patrick Gervais. Passive response of saccharomyces cerevisiae to osmotic shifts : cell volume variations depending on the physiological state. *Biochemical and biophysical research communications*, 227 :519–523, 1996.

[29] Carolyn J Decker and Roy Parker. P-Bodies and Stress Granules : Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation.

[30] Morgan Delarue, Gregory P Brittingham, Stefan Pfeffer, IV Surovtsev, S Pinglay, KJ Kennedy, M Schaffer, JI Gutierrez, D Sang, G Poterewicz, et al. mtorc1 controls phase separation and the biophysical properties of the cytoplasm by tuning crowding. *Cell*, 174(2) :338–349, 2018.

[31] Morgan Delarue, Jörn Hartung, Carl Schreck, Pawel Gniewek, Lucy Hu, Stephan Herminghaus, and Oskar Hallatschek. Self-driven jamming in growing microbial populations. *Nature physics*, 12(8) :762–766, 2016.

[32] Morgan Delarue, Gregory Poterewicz, Ori Hoxha, Jessica Choi, Wonjung Yoo, Jona Kayser, Liam Holt, and Oskar Hallatschek. Scwish network is essential for survival under mechanical pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51) :13465–13470, 2017.

[33] Monika E Dolega, Sylvain Monnier, Benjamin Brunel, Jean-François Joanny, Pierre Recho, and Giovanni Cappello. Extracellular matrix in multicellular aggregates acts as a pressure sensor controlling cell proliferation and motility. *Elife*, 10 :e63258, 2021.

[34] Audrey Dussutour. *Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur le blob sans jamais oser le demander*. Des Equateurs, 2017.

[35] Albert Einstein et al. On the motion of small particles suspended in liquids at rest required by the molecular-kinetic theory of heat. *Annalen der physik*, 17(549-560) :208, 1905.

[36] R. J. Ellis. Macromolecular crowding : An important but neglected aspect of the intracellular environment, feb 2001.

[37] R. John Ellis. Macromolecular crowding : Obvious but underappreciated, oct 2001.

[38] R. John Ellis and Allen P. Minton. Join the crowd, sep 2003.

[39] Kateryna Fal, Niklas Korsbo, Juan Alonso-Serra, Jose Teles, Mengying Liu, Yassin Refahi, Marie-Edith Chaboute, Henrik Jönsson, and Olivier Hamant. Tissue folding at the organ–meristem boundary results in nuclear compression and chromatin compaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(8), 2021.

[40] Maria Elena Fernandez-Sanchez, Sandrine Barbier, Joanne Whitehead, Gaëlle Béalle, Aude Michel, Heldmuth Latorre-Ossa, Colette Rey, Laura Fouassier, Audrey Claperon, Laura Brullé, et al. Mechanical induction of the tumorigenic β-catenin pathway by tumour growth pressure. *Nature*, 523(7558) :92–95, 2015.

[41] Alice B Fulton. How crowded is the cytoplasm? *Cell*, 30(2) :345–347, 1982.

[42] Joseph G Gall. The centennial of the cajal body. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(12) :975–980, 2003.

[43] MARK M Garner and MAURICE B Burg. Macromolecular crowding and confinement in cells exposed to hypertonicity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 266(4) :C877–C892, 1994.

[44] Sina Ghaemmaghami and Terrence G Oas. Quantitative protein stability measurement in vivo. *Nature structural biology*, 8(10) :879–882, 2001.

[45] Ido Golding and Edward C Cox. Rna dynamics in live escherichia coli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31) :11310–11315, 2004.

[46] Ajaykumar Gopal, Z Hong Zhou, Charles M Knobler, and William M Gelbart. Visualizing large rna molecules in solution. *Rna*, 18(2) :284–299, 2012.

[47] Neil AR Gow, Alistair JP Brown, and Frank C Odds. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current opinion in microbiology*, 5(4) :366–371, 2002.

[48] Sielle Gramser. Alcohol and science : the party gene. *Nature*, 438(7071) :1068–1070, 2005.

[49] Noureddine Hammad. Étude de l'effet Warburg, à l'origine du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse, chez la levure Saccharomyces cerevisiae. Technical report.

[50] Gerhard Teunis Haneveld. Compression as a treatment of cancer, a historical survey. *Archivum chirurgicum Neerlandicum*, 31(1) :1–8, 1979.

[51] Leland H. Hartwell. Yeast and cancer. In *Bioscience Reports*, 2004.

[52] Danny M Hatters, Allen P Minton, and Geoffrey J Howlett. Macromolecular crowding accelerates amyloid formation by human apolipoprotein c-ii. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10) :7824–7830, 2002.

[53] Gabriel Helmlinger, Paolo A Netti, Hera C Lichtenbeld, Robert J Melder, and Rakesh K Jain. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nature biotechnology*, 15(8) :778–783, 1997.

[54] Stefan Hohmann. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(2) :300–372, 2002.

[55] Zoya Ignatova and Lila M Gierasch. Effects of osmolytes on protein folding and aggregation in cells. *Methods in enzymology*, 428 :355–372, 2007.

[56] Efe Ilker, Michele Castellana, and Jean-François Joanny. Long-time diffusion and energy transfer in polydisperse mixtures of particles with different temperatures. *arXiv preprint arXiv :2103.06659*, 2021.

[57] Donald E Ingber. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *International Journal of Developmental Biology*, 50(2-3) :255–266, 2003.

[58] GC Johnston, JR Pringle, and Leland H Hartwell. Coordination of growth with cell division in the yeast saccharomyces cerevisiae. *Experimental cell research*, 105(1) :79–98, 1977.

[59] Moshe Kafri, Eyal Metzl-Raz, Felix Jonas, and Naama Barkai. Rethinking cell growth models. *FEMS yeast research*, 16(7), 2016.

[60] Jun Soo Kim and Arun Yethiraj. Effect of macromolecular crowding on reaction rates : a computational and theoretical study. *Biophysical journal*, 96(4) :1333–1340, 2009.

[61] Benjamin D Knapp, Pascal Odermatt, Enrique R Rojas, Wenpeng Cheng, Xiangwei He, Kerwyn Casey Huang, and Fred Chang. Decoupling of rates of protein synthesis from cell expansion leads to supergrowth. *Cell systems*, 9(5) :434–445, 2019.

[62] Irina M Kuznetsova, Konstantin K Turoverov, and Vladimir N Uversky. What macromolecular crowding can do to a protein. *International journal of molecular sciences*, 15(12) :23090–23140, 2014.

[63] Daniel R Larson, Daniel Zenklusen, Bin Wu, Jeffrey A Chao, and Robert H Singer. Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene. *science*, 332(6028) :475–478, 2011.

[64] Kevin Madden, Yi-Jun Sheu, Kristin Baetz, Brenda Andrews, and Michael Snyder. Sbf cell cycle regulator as a target of the yeast pkc-map kinase pathway. *Science*, 275(5307) :1781–1784, 1997.

[65] Willem H Mager and Joris Winderickx. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in pharmacological sciences*, 26(5) :265–273, 2005.

[66] Robert Mahen and Ashok R Venkitaraman. Pattern formation in centrosome assembly. *Current opinion in cell biology*, 24(1) :14–23, 2012.

[67] Kai Mao, Ke Wang, Mantong Zhao, Tao Xu, and Daniel J Klionsky. Two mapk-signaling pathways are required for mitophagy in saccharomyces cerevisiae. *Journal of Cell Biology*, 193(4) :755–767, 2011.

[68] Helene Martin-Yken, Adilia Dagkessamanskaia, Fadi Basmaji, Arnaud Lagorce, and Jean Francois. The interaction of slt2 map kinase with knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in saccharomyces cerevisiae. *Molecular microbiology*, 49(1) :23–35, 2003.

[69] Hiroaki Matsuda, Gregory Garbes Putzel, Vadim Backman, and Igal Szleifer. Macromolecular crowding as a regulator of gene transcription. *Biophysical journal*, 106(8) :1801–1810, 2014.

[70] Renata Matuo, Fabrício G. Sousa, Daniele G. Soares, Diego Bonatto, Jenifer Saffi, Alexandre E. Escargueil, Annette K. Larsen, and João Antonio Pêgas Henriques. Saccharomyces cerevisiae as a model system to study the response to anticancer agents, oct 2012.

[71] Ohad Medalia, Igor Weber, Achilleas S Frangakis, Daniela Nicastro, Günther Gerisch, and Wolfgang Baumeister. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*, 298(5596) :1209–1213, 2002.

[72] N Meilhac, L Le Guyader, L Salome, and Nicolas Destainville. Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Physical Review E*, 73(1) :011915, 2006.

[73] Agnès Miermont. *Severe osmotic compression of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. PhD thesis.

[74] Agnès Miermont, François Waharte, Shiqiong Hu, Megan Nicole McClean, Samuel Bottani, Sébastien Léon, and Pascal Hersen. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(14) :5725–5730, apr 2013.

[75] Ron Milo, Paul Jorgensen, Uri Moran, Griffin Weber, and Michael Springer. Bionumbers—the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1) :D750–D753, 2010.

[76] Allen P Minton. Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity. *Biopolymers : Original Research on Biomolecules*, 20(10) :2093–2120, 1981.

[77] Allen P Minton. Holobiochemistry : the effect of local environment upon the equilibria and rates of biochemical reactions. *International Journal of Biochemistry*, 22(10) :1063–1067, 1990.

[78] Allen P Minton. [7] molecular crowding : analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods in enzymology*, 295 :127–149, 1998.

[79] Allen P Minton. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *Journal of biological chemistry*, 276(14) :10577–10580, 2001.

[80] Kenneth W Minton, Paul Karmin, George M Hahn, and Allen P Minton. Nonspecific stabilization of stress-susceptible proteins by stress-resistant proteins : a model for the biological role of heat shock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(23) :7107–7111, 1982.

[81] Ranjan Mishra, Frank van Drogen, Reinhard Dechant, Soojung Oh, Noo Li Jeon, Sung Sik Lee, and Matthias Peter. Protein kinase c and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51) :13471–13476, 2017.

[82] Márcio A Mourão, Joe B Hakim, and Santiago Schnell. Connecting the dots : the effects of macromolecular crowding on cell physiology. *Biophysical journal*, 107(12) :2761–2766, 2014.

[83] Márcio A. Mourão, Joe B. Hakim, and Santiago Schnell. Connecting the dots : The effects of macromolecular crowding on cell physiology, dec 2014.

[84] Ramakanth Neeli-Venkata, Celia Municio Diaz, Ruben Celador, Yolanda Sanchez, and Nicolas Minc. Detection of surface forces by the cell-wall mechanosensor wsc1 in yeast. *Developmental Cell*, 2021.

[85] Hiroshi ŌNishi. Osmophilic yeasts. volume 12 of *Advances in Food Research*, pages 53–94. Academic Press, 1963.

[86] Federation of European Societies of Plant Physiology. Effects of osmotic shock and calcium on growth and solute composition of phaseolus vulgaris plants. *Physiologia Plantarum*, 91(3) :468, 1994.

[87] Graciele A Oliveira, Erich B Tahara, Andreas K Gombert, Mario H Barros, and Alicia J Kowaltowski. Increased aerobic metabolism is essential for the beneficial effects of caloric restriction on yeast life span.

[88] Sean M O'Rourke and Ira Herskowitz. The hog1 mapk prevents cross talk between the hog and pheromone response mapk pathways in saccharomyces cerevisiae. *Genes & development*, 12(18) :2874–2886, 1998.

[89] Tereza Pereira De Souza, Frank Steiniger, Pasquale Stano, Alfred Fahr, and Pier Luigi Luisi. Spontaneous Crowding of Ribosomes and Proteins inside Vesicles : A Possible Mechanism for the Origin of Cell Metabolism.

[90] Laura B. Persson, Vardhaan S. Ambati, and Onn Brandman. Cellular control of viscosity counters changes in temperature and energy availability. *Cell*, 183(6) :1572–1585.e16, 2020.

[91] Elzbieta Petelenz-Kurdziel, Emma Eriksson, Maria Smedh, Caroline Beck, Stefan Hohmann, and Mattias Goksör. Quantification of cell volume changes upon hyperosmotic stress in saccharomyces cerevisiae. *Integrative Biology*, 3(11) :1120–1126, 2011.

[92] Yael Phillip, Vladimir Kiss, and Gideon Schreiber. Protein-binding dynamics imaged in a living cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5) :1461–1466, 2012.

[93] Erik Postma, Cornelis Verduyn, W Alexander Scheffers, and Johannes P Van Dijken. Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of Saccharomyces cerevisiae. Technical Report 2, 1989.

[94] Paolo P Provenzano, Carlos Cuevas, Amy E Chang, Vikas K Goel, Daniel D Von Hoff, and Sunil R Hingorani. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 21(3) :418–429, 2012.

[95] Guoping Ren, Zong Lin, Chen-lu Tsou, and Chih-chen Wang. Effects of macromolecular crowding on the unfolding and the refolding of d-glyceraldehyde-3-phosophospate dehydrogenase. *Journal of protein chemistry*, 22(5) :431–439, 2003.

[96] Nelson Rhodes, Laurie Connell, and Beveriy Errede. Ste11 is a protein kinase required for cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast. *Genes & Development*, 4(11) :1862–1874, 1990.

[97] Germán Rivas, Javier A Fernandez, and Allen P Minton. Direct observation of the self-association of dilute proteins in the presence of inert macromolecules at high concentration via tracer sedimentation equilibrium : theory, experiment, and biological significance. *Biochemistry*, 38(29) :9379–9388, 1999.

[98] Natsuko Rivera-Yoshida, Juan A Arias Del Angel, and Mariana Benítez. Microbial multicellular development : mechanical forces in action. *Current opinion in genetics & development*, 51 :37–45, 2018.

[99] Ilaria Francesca Rizzuti, Pietro Mascheroni, Silvia Arcucci, Zacchari Ben-Mériem, Audrey Prunet, Catherine Barentin, Charlotte Rivière, Hélène Delanoë-Ayari, Haralampos Hatzikirou, Julie Guillermet-Guibert, et al. Mechanical control of cell proliferation increases resistance to chemotherapeutic agents. *Physical Review Letters*, 125(12) :128103, 2020.

[100] Manuel S Rodriguez, Catherine Dargemont, and Françoise Stutz. Nuclear export of rna. *Biology of the Cell*, 96(8) :639–655, 2004.

[101] Kenji Sasahara, Peter McPhie, and Allen P Minton. Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding. *Journal of molecular biology*, 326(4) :1227–1237, 2003.

[102] I. F. Sbalzarini and P. Koumoutsakos. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *Journal of Structural Biology*, 151(2) :182–195, aug 2005.

[103] Kurt M Schmoller, JJ Turner, M Kõivomägi, and Jan M Skotheim. Dilution of the cell cycle inhibitor whi5 controls budding-yeast cell size. *Nature*, 526(7572) :268–272, 2015.

[104] Ron Sender, Shai Fuchs, and Ron Milo. Are we really vastly outnumbered? revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 164(3) :337–340, 2016.

[105] Fred Sherman. Getting started with yeast. *Methods in enzymology*, 350 :3–41, 2002.

[106] Rui D Silva, Roberto Sotoca, Björn Johansson, Paula Ludovico, Filipe Sansonetty, Manuel T Silva, José M Peinado, and Manuela Côrte-Real. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in saccharomyces cerevisiae. *Molecular microbiology*, 58(3) :824–834, 2005.

[107] Stephen Smith and Ramon Grima. Fast simulation of Brownian dynamics in a crowded environment. *Journal of Chemical Physics*, 2017.

[108] M von Smoluchowski. Drei vortrage uber diffusion, brownsche bewegung und koagulation von kolloidteilchen. *Zeitschrift fur Physik*, 17 :557–585, 1916.

[109] Philip S Stewart and Channing R Robertson. Microbial growth in a fixed volume : studies with entrapped escherichia coli. *Applied microbiology and biotechnology*, 30(1) :34–40, 1989.

[110] Triantafyllos Stylianopoulos, John D Martin, Vikash P Chauhan, Saloni R Jain, Benjamin Diop-Frimpong, Nabeel Bardeesy, Barbara L Smith, Cristina R Ferrone, Francis J Hornicek, Yves Boucher, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38) :15101–15108, 2012.

[111] Venkata Suresh, Vajrala A¥, Baptiste Alric, Adrian Laborde, Camille Colin, Emmanuel Suraniti, Pierre Temple-Boyer, Stephane Arbault, Morgan Delarue, and Jérome Launay. Microwell array based opto-electrochemical detections revealing co-adaptation of rheological properties and oxygen metabolism in budding yeast.

[112] Marcin Tabaka, Tomasz Kalwarczyk, Jedrzej Szymanski, Sen Hou, and Robert Holyst. The effect of macromolecular crowding on mobility of biomolecules, association kinetics, and gene expression in living cells. *Frontiers in Physics*, 2 :54, 2014.

[113] Ross L Tellam, Michael J Sculley, Lawrence W Nichol, and PR Wills. The influence of poly (ethylene glycol) 6000 on the properties of skeletal-muscle actin. *Biochemical Journal*, 213(3) :651–659, 1983.

[114] Tara TeSlaa and Michael A Teitell. Techniques to monitor glycolysis. *Methods in enzymology*, 542 :91–114, 2014.

[115] Nobuhiko Tokuriki, Masataka Kinjo, Shigeru Negi, Masaru Hoshino, Yuji Goto, Itaru Urabe, and Tetsuya Yomo. Protein folding by the effects of macromolecular crowding. *Protein Science*, 13(1) :125–133, 2004.

[116] Miguel Trejo, Carine Douarche, Virginie Bailleux, Christophe Poulard, Sandrine Mariot, Christophe Regeard, and Eric Raspaud. Elasticity and wrinkled morphology of bacillus subtilis pellicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6) :2011–2016, 2013.

[117] Marina Uroz, Sabrina Wistorf, Xavier Serra-Picamal, Vito Conte, Marta Sales-Pardo, Pere Roca-Cusachs, Roger Guimerà, and Xavier Trepat. Regulation of cell cycle progression by cell–cell and cell–matrix forces. *Nature cell biology*, 20(6) :646–654, 2018.

[118] Vladimir N Uversky, Elisa M Cooper, Kiowa S Bower, Jie Li, and Anthony L Fink. Accelerated α-synuclein fibrillation in crowded milieu. *FEBS letters*, 515(1-3) :99–103, 2002.

[119] Bert van den Berg, Rachel Wain, Christopher M Dobson, and R John Ellis. Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics : implications for folding inside the cell. *The EMBO journal*, 19(15) :3870–3875, 2000.

[120] Alexei Vazquez and Zoltán N Oltvai. Macromolecular crowding explains overflow metabolism in cells. *Scientific Reports*, 6(1) :1–7, 2016.

[121] Adriana Verschoor, Jonathan R Warner, Suman Srivastava, Robert A Grassucci, and Joachim Frank. Three-dimensional structure of the yeast ribosome. *Nucleic acids research*, 26(2) :655–661, 1998.

[122] Dongguang Wei, Scott Jacobs, Shannon Modla, Shuang Zhang, Carissa L Young, Robert Cirino, Jeffrey Caplan, and Kirk Czymmek. High-resolution three-dimensional reconstruction of a whole yeast cell using focused-ion beam scanning electron microscopy. *Biotechniques*, 53(1) :41–48, 2012.

[123] Jacob Wilf, Jules A Gladner, and Allen P Minton. Acceleration of fibrin gel formation by unrelated proteins. *Thrombosis research*, 37(6) :681–688, 1985.

[124] Denis Wirtz. Particle-tracking microrheology of living cells : principles and applications. *Annual review of biophysics*, 38 :301–326, 2009.

[125] John L. Woolford and Susan J. Baserga. Ribosome biogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, 195(3) :643–681, 2013.

[126] Hiroyuki Yamada, Masashi Yamaguchi, Kiminori Shimizu, Somay Yamagata Murayama, Satoshi Mitarai, Chihiro Sasakawa, and Hiroji Chibana. Structome analysis of escherichia coli cells by serial ultrathin sectioning reveals the precise cell profiles and the ribosome density. *Microscopy*, 66(4) :283–294, 2017.

[127] Paul H Yancey, Mary E Clark, Steven C Hand, R David Bowlus, and George N Somero. Living with water stress : evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566) :1214–1222, 1982.

[128] Xiaoxue Yang, Yi Shen, Elena Garre, Xinxin Hao, Daniel Krumlinde, Marija Cvijović, Christina Arens, Thomas Nyström, Beidong Liu, and Per Sunnerhagen. Stress granule-defective mutants deregulate stress responsive transcripts. *PLoS genetics*, 10(11) :e1004763, 2014.

[129] Qiuting Zhang, Jian Li, Japinder Nijjer, Haoran Lu, Mrityunjay Kothari, Ricard Alert, Tal Cohen, and Jing Yan. Mechanical stress determines morphogenesis and cell ordering in confined bacterial biofilms. *bioRxiv*, 2021.

[130] Huan-Xiang Zhou, Germán Rivas, and Allen P Minton. Macromolecular crowding and confinement : biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys.*, 37 :375–397, 2008.

[131] Martin Zieger and Andreas Mayer. Yeast vacuoles fragment in an asymmetrical two-phase process with distinct protein requirements. *Molecular biology of the cell*, 23(17) :3438–3449, 2012.

[132] Steven B. Zimmerman and Stefan O. Trach. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*, 222(3) :599–620, dec 1991.

Annexe B

Annexe : article 1

Macromolecular crowding limits growth under pressure

Baptiste Alric[1], Cécile Formosa-Dague[2], Etienne Dague[3], Liam J. Holt[4,†] & Morgan Delarue[1,†]

[1]MILE team, CNRS, UPR8001, LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31400 Toulouse, France [2]TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRAE, INSA, Toulouse, France [3]ELIA team, CNRS, UPR8001, LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31400 Toulouse, France [4]New York University Grossman School of Medicine, Institute for Systems Genetics, 435 E 30th Street, New York, NY, United States
† to whom correspondence should be addressed: liam.holt@nyulangone.org; morgan.delarue@laas.fr

Cells that grow in confined spaces eventually build up mechanical compressive stress. This growth-induced pressure (GIP) decreases cell growth. GIP is important in a multitude of contexts from cancer, to microbial infections, to biofouling, yet our understanding of its origin and molecular consequences remains limited. Here, we combine microfluidic confinement of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, with rheological measurements using genetically encoded multimeric nanoparticles (GEMs) to reveal that growth-induced pressure is accompanied with an increase in a key cellular physical property: macromolecular crowding. We develop a fully calibrated model that predicts how increased macromolecular crowding hinders protein expression and thus diminishes cell growth. This model is sufficient to explain the coupling of growth rate to pressure without the need for specific molecular sensors or signaling cascades. As molecular crowding is similar across all domains of life, this could be a deeply conserved mechanism of biomechanical feedback that allows environmental sensing originating from the fundamental physical properties of cells.

Cells in every kingdom of life can proliferate in spatially-limited environments. In metazoans, tissues have physical boundaries[1]. In plants, roots sprout into a solid ground[2, 3]. In microbes, substrate adhesion physically limits colony expansion[4–6]. To proliferate in confinement, cells must push on the boundaries of their environment and neighboring cells, leading to development of compressive forces that translate, at the multicellular scale, into the buildup of a mechanical growth-induced pressure, hereafter denoted GIP. GIP decreases cell growth and division of all organisms: bacteria, fungi, plants or mammals[7–12]. However, the mechanisms that control proliferation under GIP remain unknown. In particular, it is unclear whether growth reduction is due to specific signaling pathways, or is a necessary consequence to changes of the physical properties of the cells.

Some signaling pathways have been associated with survival or division under GIP[13, 14], but it remains unclear if these pathways affect growth *per se*. For example, mutants in the SCWISh network, composed of the Cell Wall Integrity pathway and signaling from *Ste11* through *Msb2/Sho1* proteins tend to lyse due to mechanical instabilities associated with budding, but their ability to develop GIP is unperturbed[14].

On the other hand, mechanical perturbations to cells also influence fundamental physical parameters. One such parameter is macromolecular crowding, which relates to the high packing fraction of macromolecules in the cell, and can decrease biochemical reaction rates due to decreased effective diffusion[15–18]. However, the role of crowding in response to mechanical stress in general, and GIP in particular, has been largely overlooked.

In this Letter, we investigated the relationship between growth-induced pressure, macromolecular crowding and cell growth in the budding yeast *S. cerevisiae*. Our results are best explained by a model in which the rates of intracellular osmolyte production and macromolecular biogenesis are intrinsically coupled. To develop GIP, osmolytes and macromolecules are produced, while cell expansion is limited, causing the cell interior to become crowded, leading to a biophysical feedback that limits cell growth.

We used microfluidic elastic chambers as a model confining 3D environment (Fig. 1a, more details in Fig. S1)[19]. After filling the chamber, cells pushed against their neighbors and onto their surroundings. Cells were continually fed through microchannels to prevent nutrient depletion and enable switching of media. After 10 hours of confined growth, the elastic chamber was quite deformed, almost doubling in volume. This deformation was used to measure the amount of growth-induced pressure, GIP, developed by the cells[9, 14]. We posited that, under confinement, GIP resulted from an increase in intracellular osmotic pressure, which was balanced not only by the cell wall but also by the surrounding effective elasticity of the other cells and the PDMS chamber.

Remarkably, cell size did not decrease as GIP increased (Fig. 1b), even though cells became highly deformed (Inset Fig. 1b). The deformation of cells was a consequence of compressive forces. These forces can originate from an increase in the intracellular osmotic pressure that, due to confinement, applies forces to the chamber and to surrounding cells, thereby deforming them, like inflating balloons inside a box (see Inset Fig. 1c). Strikingly, we observed a strong reduction in nuclear volume (Fig. 1c) and, as a result, the nuclear-to-cell volume ratio was perturbed. This is distinct from osmotic stress which leads to a proportional reduction of the nuclear volume, keeping the

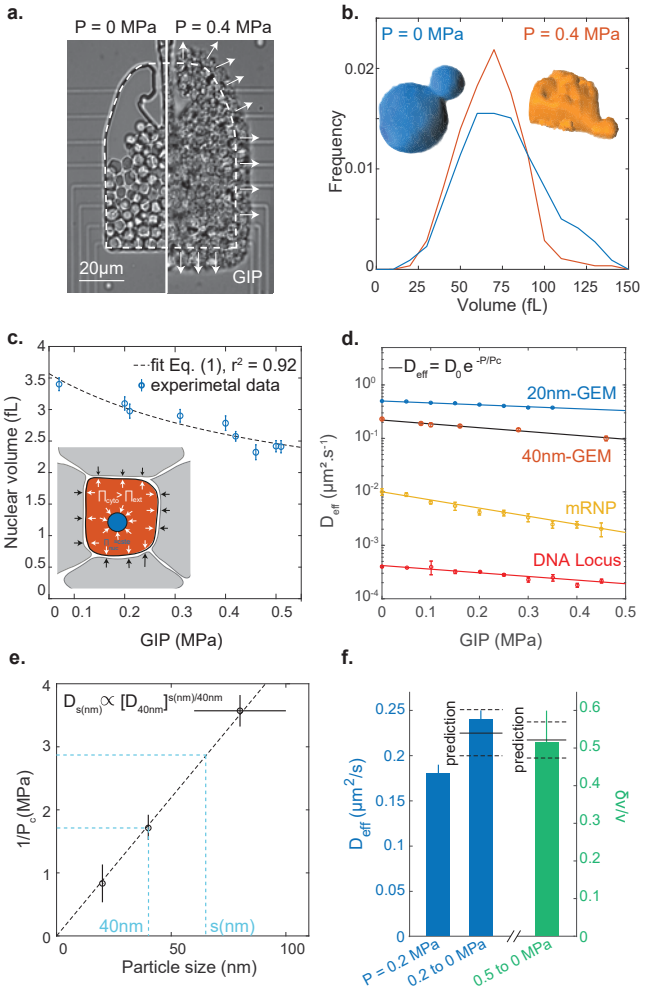


Figure 1 Confined growth leads to the intracellular accumulation of osmolytes and macromolecules. a. Confined growth leads to the build-up of growth-induced pressure (GIP), measured by the deformation of the PDMS chamber. **b.** Cell volume distribution under GIP. Insets: representative 3D reconstructions of a non-compressed cell and a cell at 0.4 MPa. Both cells have a similar volume $\sim$ 65 fL. **c.** Nuclear volume decreases under GIP. Dashed line: fit of nuclear volume as a function of GIP assuming constant nuclear osmotic pressure Eq. (1) ($r^2 = 0.92$). **d.** Diffusivities of various particles and a DNA locus all decrease exponentially as a function of GIP. Solid black curve is the model prediction for 40nm-GEMs $r^2 = 0.98$. **e.** The characteristic pressure (P_c) of the exponential dependence is inversely proportional to cytosolic particle size. **f.** After sudden pressure relaxation, effective diffusion rises quickly (< 1 minute) to control (uncompressed) values and cell volume increases (δv) due to stored osmotic pressure. Predicted values are indicated. The diffusion data fall within 7% of the prediction, while the volume data fall within 2%. In all data, values are mean $\pm$ standard error of the mean, N $\geq$ 3 independent biological replicates.

nuclear/cytoplasmic volume ratio constant as in [20] (Fig. S2).

We can subdivide osmolytes into two classes, small and large, that we operationally define by their ability to freely diffuse across the nuclear pore, a cutoff value of $\sim$ 3 nm hydrodynamic radius[21]. The concentration of small osmolytes is dominated by ions and metabolites such as glycerol, while large osmolytes are macromolecules such as proteins, ribosomes and mRNA. The decrease in nuclear volume under osmotic stress is indicative of an increase in the concentration of cytoplasmic macromolecules. The changes in nuclear volume under GIP suggested that the concentration of cytoplasmic macromolecules was also increasing under GIP. In agreement, our data were best fit assuming that these two osmolytes (small osmolytes and macromolecules) were increasing proportionally. Assuming that nuclear osmolarity did not adapt, we predicted that the nuclear volume v_n would decrease with GIP, denoted P, as (more details in section II.A of the SI):

$$\frac{\delta v_n}{v_n} = -\frac{P/\Pi_0}{1+P/\Pi_0} \qquad (1)$$

where Π_0 is the intracellular nominal (P = 0 MPa) osmotic pressure and P corresponds to the surplus internal osmotic pressure above Π_0. We fitted the nuclear volume data with $v_n = v_n^0(1+\delta v_n/v_n)$ ($r^2 = 0.92$) and obtained $\Pi_0 \sim 0.95 \pm 0.05$ MPa (dashed line Fig. 1c). We measured the osmotic pressure of the culture medium at 30°C to be $\Pi_e \sim 0.63$ MPa, leading to a nominal osmotic pressure difference between the cell interior and the cell exterior $\Delta\Pi \sim 0.3$ MPa, in agreement with values from the literature[22]. Since macromolecule concentration was increasing while cell volume remained constant, we predicted that macromolecular crowding would increase under GIP.

Changes in macromolecular crowding can be inferred by particle tracking microrheology[23]. We recently developed genetically-encoded multimeric (GEM) nanoparticles as highly efficient tracer particles for microrheology[23]. Introduction of a gene that encodes a self-assembling scaffold protein tagged with a fluorescent protein generates cells that constitutively contain tracer particles of defined sizes. In this study, we used GEMs of 20 nm (20nm-GEMs) and 40 nm (40-nm-GEMs) diameter. These particles probe the mesoscale, the length-scale of multimeric macromolecular assemblies such as RNA polymerase and ribosomes.

Using probes of various sizes, we found that the increase in cytoplasmic crowding under mechanical compression depended strongly on length-scale (Fig. 1d): the effective diffusion of larger particles such as mRNA ($\sim$ 80 nm diameter[24]), decreased far more than that of smaller particles such as 20nm-GEMs. We also found that the diffusion of a DNA locus decreased with GIP, probably as a consequence of decreased nuclear volume leading to increased nuclear crowding. Interestingly, the diffusivity of every tracer particle was compatible

with an exponential decay similar to what was observed *in vitro* in [16], more apparent for larger mRNP particles (Fig. S3):

$$D = D_0 e^{-P/P_c} \quad (2)$$

Where D_0 is the nominal diffusion of each particle, P is the growth induced pressure (GIP), and P_c is the characteristic pressure of the exponential dependence on GIP for each particle. This exponential dependence of diffusion on GIP is theoretically predicted from the Doolittle relationship, as previously described[23] (see Modeling in SI). However, as above, this prediction only applies if osmolytes and macromolecules maintain a fixed, proportional concentration. We found that $P_c \propto \Pi_i/\zeta$, where ζ is a constant related to the interactions of the nanoparticle with its surroundings. Using osmotic perturbations to instantaneously modify crowding (Fig. S4), we were able to measure $P_c \sim 0.6$ MPa for 40nm-GEMs. Using this value our theory predicts well our empirical data (solid black line in Fig. 1d is the prediction, red dots are the data).

Experimentally, we found that the characteristic pressure P_c depended on particle size, and was inversely proportional to the probe size s ($1/P_c = \beta s$ where β is the proportionality constant, Fig. 1e). This inverse relation implies that the effective cytosolic diffusion for a particle of any size, s (in nm) is a power law function of the diffusion at 40 nm: $D_s \propto e^{-\beta s P} = e^{-\beta s P * 40/40} = \left(e^{-\beta * 40 * P}\right)^{s/40} \propto {D_{40\text{nm}}}^{s/40}$. Using this relationship, we can predict cytosolic diffusivity at any length-scale from the effective diffusion of 40nm-GEMs ($D_{40\text{nm}}$).

Our data strongly suggest that confined growth leads to a concomitant increase in both internal osmotic pressure (leading to GIP and cell deformation) and macromolecular crowding (as evidenced by nuclear compaction and decreased nanoparticle diffusivity). Theory successfully predicts these observations if the increase in GIP and crowding are proportional. Another prediction of this proportional coupling is that relaxation of mechanical stress should lead to a cell volume increase proportional to GIP (see Modeling), $\delta v/v = P/\Pi_0$; and for macromolecular crowding (and thus diffusivity) to reset to the nominal value without GIP. To test this prediction, we used a device in which GIP could be quickly relaxed Fig. S5). Consistent with our model, we observed a fast, fully reversible and predictable increase in cell volume, and recovery of GEM diffusion upon instantaneous relaxation of GIP (Fig. 1f). Together, this set of observations show that confined growth is compatible with a proportional increase in osmolyte and macromolecule concentration.

We next sought to investigate how GIP affects cell growth and protein production (which is dependent on the rates of multiple biochemical reactions). We first measured changes in cell number and chamber volume to estimate the cellular growth rate (Methods, Fig. S6). We observed that growth rate decreased roughly exponentially with GIP (Fig. 2a). To get insight into protein production, we used a fluorescent reporter assay. Protein production can take hours, raising the problem that GIP would continue to increase during the experiment if growth continued. To avoid this issue, we expressed the mCherry fluorescence protein from the *ADH2* promoter (P_{ADH2}-*mCherry*) as our model system. The *ADH2* promoter is activated by glucose starvation, a condition that also arrests cell growth[25]. Thus, we could grow cells to develop a defined amount of GIP and then induce P_{ADH2}-*mCherry* by withdrawal of glucose (osmotically balancing with sorbitol) at a range of GIP values. In this way, we could infer how protein expression, at least of this model gene, was affected by GIP. We observed that the induction of the fluorescence signal was slower under GIP than in the control (Fig. 2b).

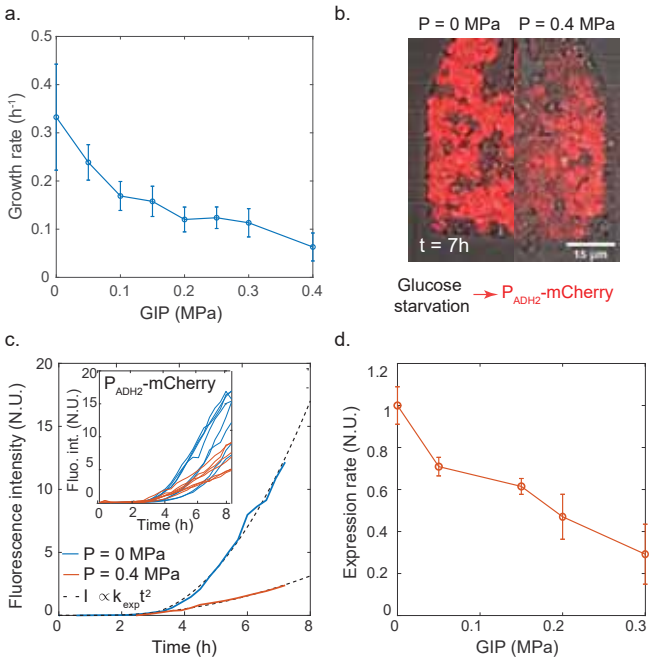


Figure 2 Confinement decreases growth and protein production rates. a. Growth rate decays roughly exponentially with GIP. **b.** Representative images from protein production reporter system. A reporter gene consisting of the mCherry fluorescent protein under the control of the *ADH2* promoter was integrated at the endogenous locus; glucose starvation induces the gene. After 7 h of induction, we observe stronger induction for control (no pressure, left) condition than under GIP (right). **c.** Single cell fluorescence intensities were fitted with a quadratic function (see Method) to extract an effective expression rate k_{exp} at various values of GIP. Representative curves for a single cell is shown with fitting; multiple single cell traces are shown inset. **d.** Protein expression rate decreases roughly exponentially with GIP. In all data, values are mean $\pm$ standard error of the mean, over n $\geq$ 100 cells in N $\geq$ 3 independent biological replicates.

This experimental strategy enabled us to extract single-cell P_{ADH2}-*mCherry* fluorescence intensity curves. We observed that, after an initial time delay, which could be associated with sensing of carbon starvation or promoter remodeling, fluorescence intensity increased with time, and that this rate of increase was lower in compressed cells. We developed a mathematical model of transcription followed by translation to quantify induction of fluorescence. Our model predicted that protein concentration should increase quadratically with time at short time scale, with an effective rate k_{exp} that is the product of the transcription rate (k_{m}) and the translation rate (k_{p}): $k_{\mathrm{exp}} = k_{\mathrm{m}} * k_{\mathrm{p}}$ (see Modeling). Although k_{exp} was not *stricto sensu* a rate, but rather the product of two rates, we refer to it as a single effective rate hereafter, for the sake of simplicity.

Our simple model yielded an excellent fit to the experimental data (Fig. 2c), and enabled us to extract both the time delay and k_{exp}. We observed that the time delay was progressively shorter with GIP (Fig. S7). It has previously been shown that cells in the G1 phase of the cell cycle respond more rapidly to stress[25], and our previous studies showed that *S. cerevisiae* arrests in G1 in response to GIP[9, 26]. Therefore, accumulation of cells in G1 could explain this reduced lag-time under GIP. We found that k_{exp} decreased roughly exponentially with GIP (Fig. 2d), with a similar dependence as the growth rate decay (about 60% decrease at $P = 0.3$ MPa in both cases). We confirmed the reduction of protein production rate on the expression of a constitutively active P_{HIS3}-*GFP* construct, suggesting that our results were not specific to the use of P_{ADH2}-*mCherry* (Fig. S8).

Our microrheology data and nuclear compression demonstrated that macromolecular crowding increased under GIP. We hypothesized that this crowding could limit protein expression rate and ultimately growth itself. This feedback could be physical as a result of decreases in the rate of diffusion-limited processes, with no need for specific signaling pathways. To test this idea, we set out to perturb molecular crowding by orthogonal means, using osmotic compression.

HOG1 is a key kinase in the osmotic stress pathway. *hog1*Δ mutant cells cannot rapidly respond to acute osmotic stress, [27], but can still expand and grow[28], a process that depends upon osmotic pressure difference[29]. Thus, at least two mechanisms generate osmotic pressure: a basal process that we find to be coupled to macromolecule production, and an acute stress response dependent of osmolyte production. Even though the latter process is disrupted in *hog1*Δ mutant cells, these cells still actively produce osmolytes through the basal process, allowing them to continue to expand and grow. We performed laser ablation experiments and confirmed that *hog1*Δ cells still maintain an osmotic pressure difference, even after osmotic compression (Fig. S9). However, osmotic compression of these cells leads to a reduction in cell volume, and consequently an increase in crowding at every size-scale, very similar to the situation

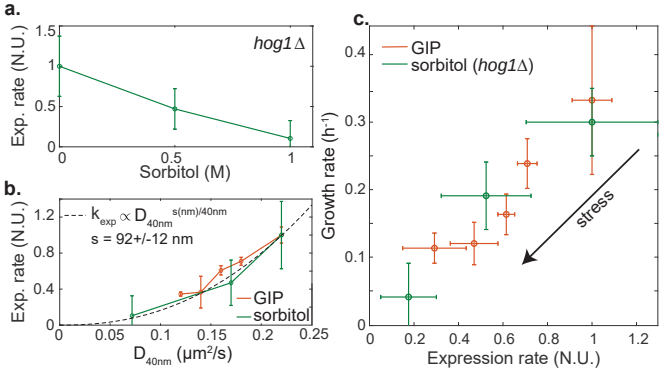


Figure 3 Protein production and growth are diffusion limited processes. a. Effective expression rate (k_{exp}) of P_{ADH2}-*mCherry* decreases under osmotic stress in *hog1*Δ cells. **b.** k_{exp} was fitted by a power-law function of the effective diffusion of 40nm-GEMs. **c.** Growth rate is proportional to protein production rate for *hog1*Δ cells under osmotic stress and *WT* cells under GIP. In all data, values are mean ± standard error of the mean, over N ≥ 3 independent biological replicates.

under GIP. This makes osmotically compressed *hog1*Δ cells a useful orthogonal system that allows us to maintain incrased macromolecular crowding for sufficient time to assess growth and protein expression rates. Consistent with our hypothesis, we found that k_{exp} of P_{ADH2}-*mCherry* decreased with osmotic compression (Fig. 3a).

GIP and osmotic compression are orthogonal means of increasing molecular crowding and activate distinct stress response pathways. Furthermore, the osmotic stress response is largely abrogated in *hog1*Δ cells[27]. If the effective expression rate (k_{exp}) of P_{ADH2}-*mCherry* is modulated by macromolecular crowding, then k_{exp} should display the same relationship to the effective diffusion of 40nm-GEMs ($D_{40\mathrm{nm}}$) under both GIP and osmotic compression. Indeed, we observed the same dependence in both conditions (Fig. 3b) supporting the hypothesis that macromolecular crowding limits protein expression.

Our results are consistent with effective protein expression rate being diffusion-limited at a certain unknown length-scale, s. We found that the relationship between effective diffusion and particles diameter was a power law (Fig 1e). If crowding decreases P_{ADH2}-*mCherry* production by inhibiting diffusion of a rate-limiting particle, effective expression rate should be a power law function of $D_{40\mathrm{nm}}$ with an exponent that is the ratio of the particle size, s (in nm), divided by the size of 40nm-GEMs (i.e. 40 nm):

$$k_{\mathrm{exp}} \propto D_s \propto {D_{40\mathrm{nm}}}^{s/40} \tag{3}$$

Indeed, we observed this power-law dependence, with an exponent that suggests that expression was limited by the diffusion of particles of a characteristic size $s \sim 90$ nm (Fig 3b). This

mesoscale length-scale corresponds to many biological entities, for example trafficking vesicles and mRNA ribonucleoprotein particles[24, 30, 31] (both $\sim$ 100 nm).

We next investigated the hypothesis that growth rate is mainly limited by protein expression. We plotted growth rate as a function of the effective expression rate of P_{ADH2}-*mCherry* and found that the two rates were roughly proportional. Note, this model gene is not limiting growth-rate, *ADH2* is not expressed in the presence of glucose. Nevertheless, the fundamental processes required for its expression (e.g. transcription by RNA polymerase II and translation by ribosomes) are shared by all proteins. Interestingly, we observed that the same relationship held for both osmotic compression of *hog1*Δ cells and *WT* cells under GIP (Fig. 3c). Even osmotically compressed, *hog1*Δ cells are still able to grow. The fact that growth rate similarly decreases with protein production under both osmotic stress and GIP indicates that similar limiting mechanisms could be at play.

Taking all of our results together, we developed a model of confined growth, with all parameters experimentally determined, allowing us to predict protein production and cell growth in confined conditions. The model derivation and parameterization are detailed in the Supplementary Information.

Our data support a central hypothesis that osmolyte and macromolecule production rates are tightly coupled. Exactly how this balance of rates is achieved remains unknown and is a longstanding fundamental question, but as a consequence, in the absence of confinement, cells grow and accumulate biomass while maintaining a constant level of macromolecular crowding. The accumulation of osmolytes increases osmotic pressure. The mechanical balance between osmotic pressure and the elastic properties of the cell wall in turn defines the turgor pressure[32]. This turgor pressure enables the cell wall to expand through a process of hydrolysis and insertion of new cell wall material[29, 33]. We posit that insertion of cell wall material is only possible when the turgor pressure resulting from osmolyte accumulation is above a fixed value.

If the effective elasticity of the cell wall, encompassing the various mechanical parameters such as its Young modulus and Poisson ratio or thickness, were to increase (i.e. require more force to be deformed), a higher pressure-difference, and thus more osmolytes, would be required to achieve expansion. This is also the case during confined growth where the surroundings mechanically resist cell growth. Confined growth leads to an effective increase in the elasticity around the cell which then physically limits cell wall expansion (Fig. 4a). In our experiments, when cells fill the confining chamber and start to distort one another and the chamber walls, they experience an effective surrounding elasticity, E_{eq}. When cells grow by δv, they need to accumulate more osmolytes to expand the cell wall, resulting in an increased internal pressure, which is the product of the surrounding effective elasticity and the volume change: $E_{\mathrm{eq}} * \delta v/v$. This value is the growth-induced pressure (GIP). Based on our central hypothesis that the accumulation of osmolytes is proportionally coupled to the accumulation of macromolecular biomass, the decreased expansion rate will lead to increased crowding. This increase in crowding then feeds back onto both protein and osmolyte production, which further reduces the cell expansion rate (Fig 4a).

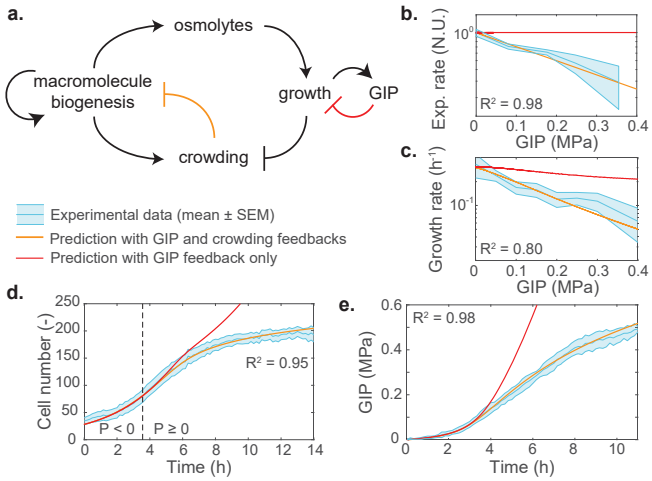


Figure 4 A physical feedback model, in which crowding limits protein production, predicts the dynamics of confined cell growth. a. Schematic of the model. After confluence is reached, growth induced pressure (GIP) increases as a function of cell volume change and the effective elasticity of the surrounding cells and PDMS chamber walls. Cells must accumulate more osmolytes to grow in the face of increasing effective elasticity, therefore volume expansion is inhibited. Macromolecule biogenesis is proportionally coupled to osmolyte production and so intracellular crowding increases. Increased mesoscale crowding feeds back onto many processes including the processes associated with macromolecule biogenesis itself, thereby limiting growth. **b-e.** Predictions of the dependence of various observables on GIP from the model. All parameters are experimentally determined. Predictions are shown for: effective protein expression rate (k_{exp}, **b**); growth rate (**c**); cell number (**d**); and GIP (**e**). In all plots, the thick orange line represents the model prediction. The thick red line represents the prediction of the model without any physical (crowding) feedback on biomass production. The dashed line represents the onset of confluence and GIP buildup. The R^2 value indicates the square difference of the model against the data. Values are mean $\pm$ standard error of the mean; N $\geq$ 3 independent biological replicates.

We calibrated the parameters related to our confining growth model, including the value of the turgor pressure, using laser ablation, transmission electron microscopy and atomic force microscopy (Supplementary Information).

Our experimentally calibrated model accurately predicted the dependence of protein production and cell growth rate on pressure, as well as the dynamics of confined cell prolifera-

tion and GIP buildup, without any fitting of free parameters (thick orange lines in Figs. 4b-d). This remarkable predictive power supports our simple model: Growth is initially limited by the surrounding elastic environment, which forces the cell to increase internal osmolarity. Osmolyte production is directly coupled to macromolecular biosynthesis thus leading to mesoscale crowding. High mesoscale intracellular crowding then physically inhibits reactions through diffusion-limited processes. Our model shows that most of the observed decrease in growth rate can be explained by this physical feedback, without the need to evoke any other mechanism.

We also investigated the predictions of our model if we removed the physical feedback (thick red lines in Figs. 4b-d). In this case, GIP and cell number would rise much more quickly than experimentally observed. Growth would still ultimately decrease, due to the increasing mechanical barrier to cell expansion, but much more slowly than observed because the rate of osmolyte production would not be limited. In this case, crowding would also rise quickly, and crowders in the cell would approach the maximum random close packing fraction much sooner. We speculate that the physical feedback of crowding on biosynthesis is adaptive, as it delays and attenuates macromolecular overcrowding, which could allow more time for stress responses to more efficiently activate. Which step of protein biosynthesis is limited by crowding is however unknown and requires a separate investigation.

An intriguing question is why cells have not evolved adaptive mechanisms to change the relative rates of macromolecular biosynthesis and osmolyte production to prevent overcrowding of the cell. The osmotic stress response is an adaptive mechanism of this type. However, we observed that GIP in *hog1*Δ mutants, which are defective for the osmotic stress pathway, was similar to that in wild-type cells (Fig. S10). A key difference between GIP and osmotic shock is the effect on turgor. The activation of the osmoadaptive *HOG1* pathway in *S. cerevisiae* is linked with a loss of turgor[34]. However, our results suggest that turgor does not decrease during GIP, and in fact increases due to the effective elasticity of the surroundings effectively acting like a thicker cell wall. Increased turgor actually triggers the hypo-osmotic stress response, which decreases intracellular osmolarity and subsequently cell volume[35]. However, this would be counterproductive during confined growth as reduced cell volume would further increase crowding. Indeed, pathways related to the response to both hyper- and hypo-osmotic stress are triggered by GIP. These pathways, which together constitute the SCWISh network[14], are important for cell survival under GIP, but they do not appear to change the coupling between osmolyte and macromolecule biosynthesis. Perhaps the feedback between mesoscale crowding and growth is useful: diffusion is affected with a strong size-dependence, mainly limiting reactions at the mesoscale ($\geq$ 10 nm diameter). It is intriguing that many stress response proteins are relatively small. Therefore, upon developing strong growth-induced pressure, growth will stall, but stress-response pathways can continue to operate.

Stress-response signaling pathways vary extensively between organisms. In contrast, high macromolecular crowding is a fundamental property of all life forms[36]. Our results suggest that a primordial biophysical feedback mechanism arises directly from the physical properties of cells. This feedback could be essential for multicellular proliferation, and its deregulation important in the context of some pathologies. Solid cancer cells in particular, in contrast with normal cells, acquire the capacity to proliferate under confinement and build up GIP, suggesting that genetic alterations, or chemical environmental modifications, can impact the ability to proliferate under confinement.

Acknowledgments

We thank E. Kassianidou for help with laser ablation experiments. We thank NYULH DART Microscopy Laboratory Alice Liang, Chris Petzold and Kristen Dancel-Manning for consultation and assistance with TEM work; this core is partially funded by NYU Cancer Center Support Grant NIH/NCI P30CA016087. The technological realisations and associated research works were partly supported by the French RENATECH network. LJH was funded by NIH grants R01 GM132447 and R37 CA240765. We thank E. Rojas for fruitful discussions. LJH and MD thank the FACE foundation for travel support.

Author Contributions

BA and MD designed and performed the experiments and data analysis; CCD and ED performed the AFM experiments; LJH designed the strains used in the study; BA, LJH and MD wrote the manuscript.

References

[1] Sebastian J Streichan, Christian R Hoerner, Tatjana Schneidt, Daniela Holzer, and Lars Hufnagel. Spatial constraints control cell proliferation in tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(15):5586–5591, 2014.

[2] AG Bengough, C Croser, and J Pritchard. A biophysical analysis of root growth under mechanical stress. In Plant Roots-From Cells to Systems, pages 107–116. Springer, 1997.

[3] Kateryna Fal, Niklas Korsbo, Juan Alonso-Serra, Jose Teles, Mengying Liu, Yassin Refahi, Marie-Edith

Chabouté, Henrik Jönsson, and Olivier Hamant. Tissue folding at the organ–meristem boundary results in nuclear compression and chromatin compaction. Proceedings of the National Academy of Sciences, 118(8), 2021.

[4] Natsuko Rivera-Yoshida, Juan A Arias Del Angel, and Mariana Benítez. Microbial multicellular development: mechanical forces in action. Current opinion in genetics & development, 51:37–45, 2018.

[5] Munehiro Asally, Mark Kittisopikul, Pau Rué, Yingjie Du, Zhenxing Hu, Tolga Çağatay, Andra B Robinson, Hongbing Lu, Jordi Garcia-Ojalvo, and Gürol M Süel. Localized cell death focuses mechanical forces during 3d patterning in a biofilm. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(46):18891–18896, 2012.

[6] Miguel Trejo, Carine Douarche, Virginie Bailleux, Christophe Poulard, Sandrine Mariot, Christophe Regeard, and Eric Raspaud. Elasticity and wrinkled morphology of bacillus subtilis pellicles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(6):2011–2016, 2013.

[7] Philip S Stewart and Channing R Robertson. Microbial growth in a fixed volume: studies with entrapped escherichia coli. Applied microbiology and biotechnology, 30(1):34–40, 1989.

[8] Eric K Chu, Onur Kilic, Hojung Cho, Alex Groisman, and Andre Levchenko. Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic escherichia coli. Nature communications, 9(1):1–10, 2018.

[9] Morgan Delarue, Jörn Hartung, Carl Schreck, Pawel Gniewek, Lucy Hu, Stephan Herminghaus, and Oskar Hallatschek. Self-driven jamming in growing microbial populations. Nature physics, 12(8):762–766, 2016.

[10] Gabriel Helmlinger, Paolo A Netti, Hera C Lichtenbeld, Robert J Melder, and Rakesh K Jain. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. Nature biotechnology, 15(8):778–783, 1997.

[11] Kévin Alessandri, Bibhu Ranjan Sarangi, Vasily Valérïévitch Gurchenkov, Bidisha Sinha, Tobias Reinhold Kießling, Luc Fetler, Felix Rico, Simon Scheuring, Christophe Lamaze, Anthony Simon, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(37):14843–14848, 2013.

[12] Ilaria Francesca Rizzuti, Pietro Mascheroni, Silvia Arcucci, Zacchari Ben-Mériem, Audrey Prunet, Catherine Barentin, Charlotte Rivière, Hélène Delanoë-Ayari, Haralampos Hatzikirou, Julie Guillermet-Guibert, et al. Mechanical control of cell proliferation increases resistance to chemotherapeutic agents. Physical Review Letters, 125(12):128103, 2020.

[13] Sungmin Nam, Vivek Kumar Gupta, Hong-pyo Lee, Joanna Y Lee, Katrina M Wisdom, Sushama Varma, Eliott Marie Flaum, Ciara Davis, Robert B West, and Ovijit Chaudhuri. Cell cycle progression in confining microenvironments is regulated by a growth-responsive trpv4-pi3k/akt-p27kip1 signaling axis. Science advances, 5(8):eaaw6171, 2019.

[14] Morgan Delarue, Gregory Poterewicz, Ori Hoxha, Jessica Choi, Wonjung Yoo, Jona Kayser, Liam Holt, and Oskar Hallatschek. Scwish network is essential for survival under mechanical pressure. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(51):13465–13470, 2017.

[15] Agnès Miermont, François Waharte, Shiqiong Hu, Megan Nicole McClean, Samuel Bottani, Sébastien Léon, and Pascal Hersen. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(14):5725–5730, 2013.

[16] Mahesh A Vibhute, Mark H Schaap, Roel JM Maas, Frank HT Nelissen, Evan Spruijt, Hans A Heus, Maike MK Hansen, and Wilhelm TS Huck. Transcription and translation in cytomimetic protocells perform most efficiently at distinct macromolecular crowding conditions. ACS Synthetic Biology, 2020.

[17] Guilherme Nettesheim, Ibtissem Nabti, Chandrashekhar U Murade, Gabriel R Jaffe, Stephen J King, and George T Shubeita. Macromolecular crowding acts as a physical regulator of intracellular transport. Nature Physics, pages 1–8, 2020.

[18] Jorge Fernandez-de Cossio-Diaz and Alexei Vazquez. A physical model of cell metabolism. Scientific reports, 8(1):1–13, 2018.

[19] Liam J Holt, O Hallatschek, and Morgan Delarue. Mechano-chemostats to study the effects of compressive stress on yeast. Methods in cell biology, 147:215–231, 2018.

[20] Elzbieta Petelenz-Kurdziel, Emma Eriksson, Maria Smedh, Caroline Beck, Stefan Hohmann, and Mattias Goksör. Quantification of cell volume changes upon hyperosmotic stress in saccharomyces cerevisiae. Integrative Biology, 3(11):1120–1126, 2011.

[21] Dirk Görlich and Ulrike Kutay. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annual review of cell and developmental biology, 15(1):607–660, 1999.

[22] IM De Mara on, Pierre-André Marechal, and Patrick Gervais. Passive response of saccharomyces cerevisiae to osmotic shifts: cell volume variations depending on the physiological state. Biochemical and biophysical research communications, 227:519–523, 1996.

[23] Morgan Delarue, Gregory P Brittingham, Stefan Pfeffer, IV Surovtsev, S Pinglay, KJ Kennedy, M Schaffer, JI Gutierrez, D Sang, G Poterewicz, et al. mtorc1 controls phase separation and the biophysical properties of the cytoplasm by tuning crowding. Cell, 174(2):338–349, 2018.

[24] Alexander Borodavka, Surendra W Singaram, Peter G Stockley, William M Gelbart, Avinoam Ben-Shaul, and Roman Tuma. Sizes of long rna molecules are determined by the branching patterns of their secondary structures. Biophysical journal, 111(10):2077–2085, 2016.

[25] Stefano Busti, Paola Coccetti, Lilia Alberghina, and Marco Vanoni. Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in saccharomyces cerevisiae. Sensors, 10(6):6195–6240, 2010.

[26] Morgan Delarue, Daniel Weissman, and Oskar Hallatschek. A simple molecular mechanism explains multiple patterns of cell-size regulation. PloS one, 12(8), 2017.

[27] Markus J Tamás and Stefan Hohmann. The osmotic stress response of saccharomyces cerevisiae. Yeast stress responses, pages 121–200, 2003.

[28] Inbal Maayan and David Engelberg. The yeast mapk hog1 is not essential for immediate survival under osmostress. FEBS letters, 583(12):2015–2020, 2009.

[29] Enrique R Rojas, Kerwyn Casey Huang, and Julie A Theriot. Homeostatic cell growth is accomplished mechanically through membrane tension inhibition of cell-wall synthesis. Cell systems, 5(6):578–590, 2017.

[30] Elias M Puchner, Jessica M Walter, Robert Kasper, Bo Huang, and Wendell A Lim. Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(40):16015–16020, 2013.

[31] Shigeo Takamori, Matthew Holt, Katinka Stenius, Edward A Lemke, Mads Grønborg, Dietmar Riedel, Henning Urlaub, Stephan Schenck, Britta Brügger, Philippe Ringler, et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. Cell, 127(4):831–846, 2006.

[32] Dominic Vella, Amin Ajdari, Ashkan Vaziri, and Arezki Boudaoud. The indentation of pressurized elastic shells: from polymeric capsules to yeast cells. Journal of the Royal Society Interface, 9(68):448–455, 2012.

[33] Peter Albersheim, Alan Darvill, Keith Roberts, Ron Sederoff, and Andrew Staehelin. Plant cell walls. Garland Science, 2010.

[34] Jörg Schaber, Miquel Angel Adrover, Emma Eriksson, Serge Pelet, Elzbieta Petelenz-Kurdziel, Dagmara Klein, Francesc Posas, Mattias Goksör, Mathias Peter, Stefan Hohmann, et al. Biophysical properties of saccharomyces cerevisiae and their relationship with hog pathway activation. European Biophysics Journal, 39(11):1547–1556, 2010.

[35] David E Levin. Cell wall integrity signaling in saccharomyces cerevisiae. Microbiology and molecular biology reviews, 69(2):262, 2005.

[36] R John Ellis. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. Trends in biochemical sciences, 26(10):597–604, 2001.

Supplementary information to: Macromolecular crowding limits growth under pressure

Baptiste Alric[1], Cécile Formosa-Dague[2], Etienne Dague[3], Liam J. Holt[4,†] & Morgan Delarue[1,†]

[1]MILE team, CNRS, UPR8001, LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31400 Toulouse, France
[2]TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRAE, INSA, Toulouse, France
[3]ELIA team, CNRS, UPR8001, LAAS-CNRS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31400 Toulouse, France
[4]New York University Grossman School of Medicine, Institute for Systems Genetics, 435 E 30th Street, New York, NY, United States
† to whom correspondence should be addressed: liam.holt@nyulangone.org; morgan.delarue@laas.fr

I. MATERIAL AND METHODS

A. Strains used in this study.

Name	background	Genotype
40nm-GEMs HTB2-mCherry	BY4741	HTB2::HTB2-mCherry-URA3; PINO4::Pfv-GS-Sapphire-LEU2
cytosolic GFP	W303	ura3::pRS306-pHIS3-2xGFP
nuclear envelop mCherry	W303	nup57::NUP57-mCherry-kanMX
20nm-GEMs	W303	ura3::PHIS3-AqLumSynth-Sapphire
mRNA particles	W303	GFA1/gfa1::GFA1-24PP7; PP7-CP-3xYFP::HIS3
DNA locus	W303	leu2::TETR-GFP:LEU2 ura3::TETOarray:URA3
P_{ADH2}-*mCherry*	BY4741	ura3Δ0::pADH2-mCherry-URA3; pINO4::Pfv-GS-Sapphire-LEU2
P_{ADH2}-*mCherry hog1*Δ	BY4742	hog1d::G418; pADH2-mCherry(URA)
40nm-GEMs *hog1*Δ	BY4742	hog1d::G418; leu2::PINO4-PfV-GS-Sapphire-LEU2; pADH2-mCherry(URA)

B. Cell culture conditions.

Cells were cultured on synthetic complete (SC) medium (with 20 g/L glucose) agar Petri dishes, and re-suspended 24h before the experiment in liquid medium at 30^oC . Cells were then loaded into the microfluidic chamber at an OD ~ 0.3. Details of the strains used can be found in the table above. All strains used in this study were fabricated in the laboratory of L. Holt, except the *Nup47-mCherry* strain which was kindly provided by A. Taddei (Institut Curie, Paris, France).

C. Induction of osmotic stress.

Sorbitol is commonly used to induce osmotic stress in *S. cerevisiae*, as it increases the osmolarity of the culture medium, while its metabolism is negligible in the presence of glucose. Note that SCD contains many permeable osmolytes, such as amino acids and glucose. Thus, their intracellular concentration is likely to participate in the intracellular osmolarity. However, they remain in large excess in the culture medium and their import is unlikely to impact the estimation of osmotic pressure difference.

Thus, to induce an osmotic stress, sorbitol was added to SC medium to induce osmotic shocks. Cells were then flowed into an Ibidi μ-slide VI coated with concanavalin A (Sigma-Aldrich) to promote cell attachment.

D. Microfabrication of PDMS devices.

Molds were created in the LAAS-CNRS clean room, through classical photo-lithography on epoxy resin SU8 (Microchems®) to create two layers: one at $0.8\mu m$ height defining the nutrient channels (SU8 2000.5), and another at $10\mu m$ height defining the cell growth chamber and the main cell loading channel (SU8 3005). Molds were treated with silane to limit interactions between the mold and the polydimethylsiloxane (PDMS).

Sylgard 184®was mixed at a ratio of 1:10 (curing agent:base) and poured on the mold to reticulate overnight at 60^oC . After this step, PDMS was cut, punched and cleaned with isopropanol to create microfluidic chips that were bound to glass coverslips by plasma binding (Diener PICO, gaz : oxygen, pressure : 0.3 mBar, power : 100% and 30 second of activation) and then cured in an oven ≥ 5 hours.

E. Microfluidic device operation.

To avoid bubbles, chambers were filled in a precise sequence: first the cell suspension was put inside chambers and then the main channel was filled with SC medium. A Fluigent MFCS pressure controller flowed SC medium into chips with a pressure of $\sim$1.5 bar during all experiments. Chips were placed within the thermo-regulated microscope chamber at 30^oC (LeicaTempcontrol37).

F. Image acquisition.

Experiments were performed on a Leica DM IRB microscope with spinning-disk confocal (Yokogawa CSU-X1) with a nominal power of 100mW and a Hamatsu sCMOS camera (Orca flash 4.0 C13440). For fluorescence acquisition we used several emission filterET450/50m(DAPI), ET525/50m(GFP),ET595/50m(Red) and a dichroic mirror Chroma ZT405/488/561/640rpc. All acquisitions used a 63x objective.

Deformation of PDMS chambers, measured by bright field microscopy, was used to infer growth induced pressure. The relationship between pressure and chamber deformation was calibrated as in[1] and gives a value of 6.8μm/MPa.

The number of cells was determined by counting nuclei every 15 minutes, detected using an *HTB2-mCherry* fluorescent histone marker, using a 561 nm laser (20% of power, 100 ms exposure). The P_{ADH2} reporter was detected using the same acquisition parameters.

G. Single-particle tracking.

Various methods could be used to assess intracellular crowding. We chose to use single-particle tracking (SPT) of nanoparticles because this approach allows a rapid estimation of crowding from the diffusion coefficient of nanoparticles, does not require calibration (in contrast with FCS), and is insensitive to changes in the chemical environment (unlike FRET-based sensors). Moreover, it reports on crowding at the tens of nanometer scale, which is the relevant scale for the diffusion of large protein complexes.

GEM nanoparticle, mRNPs and DNA locus movies were acquired by illumination with a 488 nm laser at full power. 30 images were acquired with no delay of continual exposure at 100 Hz frame-rate for GEMs, and at 10 Hz for mRNPs. DNA locus was illuminated for 100 ms and imaged every seconds.. Particle tracking was achieved with the FIJI Mosaic Suite [2] and analyzed with a home-made Matlab script.

H. Nuclear and cell volume measurement.

We took Z-stacks (0.3 μm steps) of cytosolic GFP and nuclear envelop tagged cells for volume measurement. Projection of the nuclear envelope was followed by a circular Hough analysis in Matlab to extract the radii of the largest circles corresponding to the radii of nuclei in both osmotic stress and GIP experiments. Threshold-based segmentation was used to to obtain the cell contour under osmotic stress and allow for 3D-reconstruction and cell volume measurement. However, because of the tight cellular packing, an automated cell segmentation and reconstruction was challenging for GIP data. We therefore segmented cells by hand to measure cell volume. This measurement was performed independently by BA and MD, and the obtained data mixed together to limit potential biases.

I. Glucose starvation experiments to induce P_{ADH2}-*mCherry*.

To induce the P_{ADH2}-*mCherry* reporter, cells were allowed to build up growth-induced pressure in SCD in the microfluidic devices overnight. Then, the culture medium inside the main channel was flushed and replaced by synthetic complete medium without glucose but supplemented with 200 mM of sorbitol to balance osmolarity. Note that only about 2% difference in fluorescence intensity was measured in the center *versus* the edge of the chamber (Fig. S11), suggesting that nutrient conditions were similar throughout the device.

J. Laser ablation experiments.

Cell ablation was performed on an Olympus BX51WI upright microscope (Olympus Corporation), equipped with a Swept Field Confocal (Bruker) and a Ti:Sapphire 2-Photon Chameleon Ultra II laser (Coherent). Cell autofluorescence was visualized using a 405 laser and ablation was performed using the 2-photon laser at 770 nm. Images were acquired using an Olympus 60x/1.0 objective and an electron-multiplying charge-coupled device (EM-CCD) camera (Photometrics). The experiment was set up and performed using the PrairieView Software. For each experiment, a region of interest was drawn over the cell and a time-lapse was set to thirty frames at a frame rate of 0.95 sec. Ablation was performed after the second image using three consecutive pulses of 20-ms exposure.

K. Transmission electron microscopy experiments.

Cells were prepared and imaged following the protocole detailed in[3]. Briefly, 15 mL of yeast culture (OD 600=0.5) was pelleted and resuspended in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (CB, pH 7.2) for 2 hours at room temperature, then stored at 4^oC overnight. Cells were then spun down at 1000g, washed with CB, treated with freshly prepared 1% sodium metaperiodate for one hour and then stained with 1% osmium tetroxide and 1.5% ferrocyanide for 1 hour at 4^oC. Cells were embedded in 2% agar, dehydrated in a graded series of ethanol, infiltrated with propylene oxide/EMbed 812 mixtures and embedded in EMbed 812 resin (Electron Microscopy Sciences, PA USA). 70 nm ultra-thin sections were cut and mounted on 200 mesh copper grids. The grids were stained with 6% uranyl acetate for 30 minutes and lead citrate for 2 minutes, then imaged with a Philips CM12 electron microscope (FEI; Eindhoven, The Netherlands) and photographed with a Gatan (4kx2.7k) digital camera (Gatan Inc., Pleasanton, CA).

L. Atomic Force Microscopy experiments.

AFM measurements were performed in YPD culture medium, at a controlled temperature of 30^oC, using a JPK Nanowizard III AFM (Bruker, Billerica, USA). MLCT AUWH cantilevers (Bruker, Billerica, USA) with spring constants of 0.59 and 0.38 N/m, calibrated using the thermal noise method (Hutter JL et al., Rev Sci Instrum 64, 1993). Yeast cells were immobilized on Concanavalin A coated surfaces. Force measurements were recorded in force spectroscopy mode, using applied forces of 1.5 nN and 2.0 nN, an approach/retract speed of 1 μm/s and a z-length of 0.5 μm. Force maps of 20-by-20 force curves were recorded on areas of 1 x 1 μm^2 on top of the cells. Cell spring constants were then calculated from force curves fit to Hooke's law using the JPK Data Processing Software (Bruker, Billerica, USA).

II. MATHEMATICAL MODELING

A. GIP compresses the nucleus by increasing intracellular colloid osmotic pressure.

We assumed that the nucleus was a passive osmometer in osmotic equilibrium with the cytoplasm. $\Pi_i^c = \alpha\Pi_i$ is the cytosolic colloid osmotic pressure (due to macromolecules that cannot freely diffuse through the nuclear pore), which is hypothesized to be proportional to the intracellular total osmotic pressure Π_i with a factor α. We denote Π_n the nuclear colloid osmotic pressure. Osmotic equilibrium enforces: $\Pi_i^c = \Pi_n$. When growth-induced pressure P builds up, the cytoplasmic total osmotic pressure increases from the nominal value Π_0, such that $\Pi_i = \Pi_0 + P$. Similarly, we assume that the cytosolic colloidal pressure increases to $P^c = \alpha P$, and $\Pi_0^c = \alpha\Pi_0$. This corresponds to an increase in osmolyte concentration from N_0 to N_P, while keeping the cell volume constant at v_c. We hypothesized that the change in cytosolic pressure compresses the nuclear volume, such that it decreases from v_n to $v_n + \delta v_n$. We also hypothesized that, during the buildup of GIP, there was no large increase in nuclear colloid osmotic pressure, osmotically active species remaining constant at N_n^0.

From van't Hoff's equation, under confined growth, osmotic equilibrium leads to,:

$$\frac{N_P}{v_c} = \frac{N_n^0}{v_n + \delta v_n} \tag{1}$$

Re-writing $N_n^0 = (v_n/v_c)\, N_0$ from the equilibrium without GIP, we determine the nuclear volume dependence with P to be:

$$\frac{\delta v_n}{v_n} = -\frac{P^c/\Pi_0^c}{1 + P^c/\Pi_0^c} = -\frac{P/\Pi_0}{1 + P/\Pi_0} \tag{2}$$

We used Eq. 2 to fit the experimental data of Fig. 1c, and extracted $\Pi_0 = 0.95 \pm 0.05$ MPa.

B. Change in cell volume after GIP relaxation.

We assumed, as above, that the intracellular osmotic pressure, Π_i, rose with GIP: $\Pi_i = \Pi_0 + P$, where P is growth-induced pressure. From our data, we found that cell volume, v_c^0, did not significantly change under confined growth.

Growth under pressure is therefore accompanied with an increase in osmolyte concentration, from N_0 to N_P under a pressure of P. The van't Hoff equation gives:

$$(\Pi_0 + P)\, v_c^0 = N_P RT \tag{3}$$

R is the gas constant and T is the temperature. After pressure relaxation, the volume increased by a value δv_c, equilibrating intracellular osmolarity back to the control value Π_0. This can be written to $(\Pi_0 + P)\, v_c^0 = \Pi_0 \left(v_c^0 + \delta v_c\right)$, leading to:

$$\frac{\delta v_c}{v_c^0} = \frac{P}{\Pi_0} \tag{4}$$

Eq. 4 was used to predict the volume change after pressure relaxation, performed by devices similar to those previously published in [1]. These predictions are displayed in Fig. 1f.

C. Measuring growth rate from the experimental data.

We defined the growth rate k_g of the cell population, in terms of total cell volume V_c, as:

$$\frac{\partial_t V_c}{V_c} = k_g = \frac{\partial_t N}{N} \tag{5}$$

where N is the cell number. Indeed, since the single cell volume v_c^0 remained roughly constant (Fig. 1b), $V_c = N v_c^0$. Writing that $N = \rho V$, with ρ being the cell density and V the volume of the PDMS chamber, one gets:

$$k_g = \frac{\partial_t N}{N} = \frac{\partial_t \rho}{\rho} + \frac{\partial_t V}{V} = \frac{\partial_t \rho}{\rho} + \frac{\partial_P V}{V} \partial_t P \tag{6}$$

The dependence of k_g on pressure has two contributions: cell density, and total volume. We measured both contributions independently:

- Contribution of cell density: we measured cell density in the chamber by counting cell nuclei using an *HTB2-mCherry* fluorescent histone marker.
- Contribution of cell volume: we measured the deformation of the chamber using bright-field imaging [1, 4], to infer growth-induced pressure.

Fig. S6 plots the two respective contributions from Eq. 6. Note that cell density increases quickly in the chamber, suggesting that cells are more deformable than the PDMS chamber walls.

D. Protein expression from P_{ADH2}-*mCherry*.

We developed a simple model of protein production to extract key parameters from our fluorescence reporter assay. We hypothesized that, upon switch to carbon starvation, following a time delay t_d, transcripts m were produced with a rate k_m:

$$\partial_t m = k_m \tag{7}$$

and proteins p were produced from these transcripts with a net rate $k_p m$:

$$\partial_t p = k_p m \tag{8}$$

After an induction time t_d before which no mRNAs or proteins are produced ($m(t_d) = 0$ and $p(t_d) = 0$), Eq. 7 can be solved, giving $m(t) = k_m(t - t_d)$ predicting a quadratic increase of protein concentration with time, solving

Eq. 8, as $p(t) = 1/2k_m k_p(t - t_d)^2$. Note that both k_m and k_p are effective net rates that incorporate multiple processes including transcript and protein degradation, export of the transcript from the nucleus, and fluorescent protein folding/maturation. It is impossible, from this simple fit, to extract more detailed information on which of these precise parameters is limiting for protein expression. We define instead an overall effective rate of protein production k_{exp}, such that $p(t) = k_{\text{exp}}(t - t_d)^2$.

Fluorescence intensity is proportional to the concentration of proteins $I(t) = \alpha p(t)$. The proportionality coefficient α cannot be readily predicted, and will depend on illumination conditions (intensity of the source, filters, exposure time, efficiency of the camera) and the fluorophore itself, therefore absolute protein concentration is not determined. However, the fitting of the data allows the extraction of a relative αk_{exp} for a given GIP condition. We kept the illumination conditions constant, and hypothesized that α does not depend on GIP. Renormalizing the rate for different values of pressure by the rate of the control thus allows for an estimation of the change in protein expression under GIP. Note α for mCherry does not vary significantly with crowding, in contrast to YFP *in vitro*[5].

Note on mRNA degradation: In this model we neglected mRNA degradation. Classically, the degradation rate of mRNA can be written $\partial_t m = -k_d m$. Incorporating it in Eq. 7 and solving mathematically $p(t)$, we find that, at long timescales, protein concentration should increase linearly in time following the relationship: $p(t) \sim k_m k_p/k_d t$. This linear regime is not observed experimentally, probably because we do not reach the linear regime in this experiment. At shorter timescales, including mRNA degradation, protein concentration reduces to $p(t) = 1/2k_m k_p t^2 + o(t^2)$, which is the mathematical function that we used to fit our data. The temporal range of the experiment does not appear to be large enough to extract a degradation rate and assess if this parameter changes under GIP.

E. Protein expression from P_{HIS3}-*GFP*.

We performed additional experiments on housekeeping genes to complement our results on protein synthesis with P_{ADH2}-*mCherry*. We investigated the dynamic change in fluorescence intensity of a GFP expressed from the constitutively active promoter P_{HIS3}-*GFP*. The increase in fluorescence over time can be analyzed using the following minimal assumptions:

1. Housekeeping protein production (e.g. His3p) follows the exponential cell volume increase such that protein concentration, N, increases exponentially in time[6]: $\partial_t N = k_{\text{prod}} N$.

2. Fluorescence intensity, I, is proportional to protein concentration, c.

Because $\partial_t I/I = \partial_t c/c = \partial_t N/N - \partial_t v/v = \partial_t N/N - k_{\text{growth}}$ where v is the cell volume and k_{growth} is the cellular growth rate, we can write that the derivative of the integrated fluorescence intensity as $\partial_t I/I = k_{\text{prod}} - k_{\text{growth}}$. Note that, any potential dependence of the fluorescence properties of GFP on crowding during the instantaneous quantification of protein expression from the HIS3 promoter, which occurs with almost no change in pressure or crowding, is thus normalized in this assay at almost constant pressure.

We measured the fluorescence intensity of the GFP over time and computed k_{prod} as a function of GIP according to the above equation. We superimposed this result to the P_{ADH2}-*mCherry* experiment (Fig. S8), and observed a very good agreement between these data.

F. Exponential dependence of nanoparticle diffusion with growth-induced pressure.

The Doolittle equation has been used previously to successfully relate the diffusion coefficient of nanoparticles to crowding inside the cell[7]. Denoting D_{w} as the diffusion coefficient of the nanoparticle in water, the diffusion coefficient D of a tracer nanoparticle can be expressed as[8]:

$$D = D_{\text{w}} \exp\left(-\xi \frac{v_{\text{crowder}}}{v_{\text{free}}}\right) \tag{9}$$

where v_{crowder} is the volume occupied by macromolecules and v_{free} is the free volume. The prefactor ξ relates to interactions between the tracer particle and the environment. We denote v^0_{crowder} and v^0_{free} respectively as the volume occupied by crowders and the free volume in the control (uncompressed) condition, for which $D = D_0$. We can re-write D as:

$$D = D_0 \exp\left(-\xi\left(\frac{v_{\text{crowder}}}{v_{\text{free}}} - \frac{v^0_{\text{crowder}}}{v^0_{\text{free}}}\right)\right) \tag{10}$$

We assume that cells are mainly crowded at the mesoscale by ribosomes of volume v_r, at a cytosolic concentration c_r that was previously estimated as $\sim$ 14,000 ribosomes / μm^3 [7]. In the cytosol, v_{free} refers to the cytosolic volume, such that $v_{\text{crowder}}/v_{\text{free}} = c_r v_r$. Note that this rewrites the number of ribosomes, contained in v_{crowder}, in terms of its concentration. Denoting c_r^0 the control crowder concentration, we get:

$$D = D_0 \exp\left(-\xi c_r^0 v_r\left(\frac{c_r}{c_r^0} - 1\right)\right) \tag{11}$$

Based on our experiments, we assume that the concentration of osmolytes, c_o, is proportional to the concentration of crowders, such that $c_r/c_r^0 = c_o/c_o^0$. Using the van't Hoff equation to relate the concentration of osmolytes to the osmotic pressure, and denoting Π_i the intracellular osmotic pressure, we can re-write the diffusion of 40nm-GEMs as:

$$D = D_0 \exp\left(-\xi c_r^0 v_r \frac{\Pi_i - \Pi_0}{\Pi_0}\right) = D_0 \exp\left(-\frac{\xi c_r^0 v_r}{\Pi_0} P\right) = D_0 \exp\left(-P/P_c\right) \tag{12}$$

where P is the growth-induced pressure, defined as the intracellular osmotic pressure accumulated above the control value $P = \Pi_i - \Pi_0$, and $P_c = \Pi_0/(\xi c_r^0 v_r)$ is a characteristic pressure associated with the exponential decay of the tracer particle. The inverse relationship between P_c and particle size s displayed in Fig. 1e suggests that $\xi \propto s$: the larger the nanoparticle, the larger the steric interactions, therefore the greater the effect of crowding. In principle, ξ can also incorporate other types of interactions, such as electrostatic interactions.

G. Calibration of the motion of 40nm-GEMs.

We used osmotic perturbations to calibrate the 3 parameters that define P_c for 40nm-GEMs: ξ_{40}, $c_r^0 v_r$ and Π_0. We determined the intracellular osmotic pressure as $\Pi_0 \sim 0.95$ MPa from the compression of the nucleus (Fig. 1c). Approximating the ribosome as a sphere with a radius of 15 nm, $c_r^0 v_r \sim 0.2$ [7]. ξ_{40} can be determined by instantaneously changing cell volume using osmotic compression. The volume of water in cells can be written $v_{\text{w}} = v_{\text{c}} - v_{\text{no}}$, where v_{c} is the cell volume and v_{no} is the non-osmotic volume of the cell, which corresponds to the volume occupied by the dry mass of the cell.

Keeping the number of crowders constant, Eq. 11 can be re-written:

$$D_{40} = D_0 \exp\left(-\xi_{40} c_r^0 v_r\left(\frac{v_w^0}{v_w} - 1\right)\right) = D_0 \exp\left(-\xi_{40} c_r^0 v_r\left(\frac{1 - v_{\text{c}}/v_{\text{c}}^0}{v_{\text{c}}/v_{\text{c}}^0 - v_{\text{no}}/v_{\text{c}}^0}\right)\right) \tag{13}$$

$v_{\text{no}}/v_{\text{c}}^0$ corresponds to the minimum cell volume after an osmotic compression, which we found to be about 0.4, in good agreement with previous data [7, 9]. We fitted the experimental data with Eq. 13 to extract $\xi_{40} = 7.4 \pm 2.5$ (Fig. S5). This allowed the estimation of the exponential dependence of diffusion with pressure (the characteristic pressure) to be $P_c = 0.64 \pm 0.2$ MPa. Using this value led to an excellent prediction of the effective diffusion of 40nm-GEMs as a function of GIP (Fig 1d.)

H. Modeling confined growth.

We developed a model to physically explain the phenomenology of confined cell growth. Here, we expand upon the basic ideas of cell growth, our hypothesis on what happens when cells are confined, and how we calibrated all the parameters of the model, leading to remarkable predictive power.

a. Fundamental concepts of the confined cell growth model. It has been shown that cell density remains remarkably constant as cells grow[10]. Thus, undertaking this as a starting point, in the absence of confinement, the rates of cell volume expansion and macromolecule biogenesis should be equal to maintain this constant macromolecular crowding. Cell volume expansion requires production of intracellular osmolytes, while macromolecule production requires many metabolic processes, but is limited by the production of macromolecules, including ribosomes, and subsequently proteins[6]. Indeed, we experimentally determined that growth rate was proportional to protein production rate. Thus, osmolyte and macromolecule production must be proportional to enable balanced growth. It remains unknown how exactly this proportionality is achieved, and this fundamental question is not addressed here. However, our data support the hypothesis that confined growth does not alter this proportionality.

According to this central hypothesis, cells will accumulate osmolytes and macromolecules at a proportional rate. When volume expansion is inhibited by confinement, the accumulation of macromolecules leads to an increase in crowding, while the accumulation of osmolytes results in an increase in intracellular osmotic pressure. We postulated the following sequence to describe growth in a step-by-step manner:

1. Cells produce macromolecules and osmolytes at a fixed cell volume, increasing intracellular osmotic pressure above the unconfined control value Π_0, $\Pi_i > \Pi_0$. The production of macromolecules is exponential, for example because ribosomes are rate limiting for the production of ribosomal proteins[6]. Per our central coupling hypothesis, this means that osmolyte production is also exponential. We denote this rate k_{prod}.

2. When the pressure difference between intracellular and extracellular osmolarity, $\Pi_i - \Pi_e$, exceeds a threshold value, the cell wall expands enough to allow the incorporation of new cell wall components[11, 12], leading to a cell volume increase of δv. The actual value of δv is not a critical parameter: it sets the time interval δt required to reach the threshold concentration of osmolytes, such that $\delta v/v = k_{\text{prod}}\delta t$. $\delta v/\delta t * 1/v$ sets the growth rate of the cell.

3. The resultant increase in volume partly dilutes osmolytes (and macromolecules) below the threshold value required for further cell wall expansion. Osmolytes then again accumulate at fixed volume, and the sequence is repeated.

This sequential model of cell growth naturally leads to exponential growth at a constant level of macromolecular crowding, and the intracellular osmotic pressure is continually maintained around the threshold value for cell wall expansion. **We posit that the critical pressure for cell expansion is related to the cellular turgor pressure** P_t, which corresponds to the hydrostatic pressure that balances the elasticity of the cell wall. Within this framework, if the elasticity of the cell wall were to increase, the critical pressure would also increase and so more osmolytes would be required to reach this new threshold. Since osmolyte and macromolecule production are coupled, macromolecular crowding would also necessarily increase. We hypothesize that this is what happens when cells are confined.

b. Modeling the elasticity of the confining environment. When the chamber becomes filled such that all the cells are in contact, cell expansion must overcome the additional elastic resistance of neighboring cells and the walls of the PDMS chamber. These elasticities can be modeled as two springs acting in parallel. Denoting E_c as the cell elasticity, and E_{PDMS} as the elasticity of the PDMS chamber, **the cell will be pushing against a material of an effective elasticity equivalent to** $E_{\text{eq}} = E_c\, E_{\text{PDMS}}/(E_c + E_{\text{PDMS}})$.

PDMS operates in a linear elastic regime for small deformations, such that E_{PDMS} is a constant. This is not the case for the elasticity of the cells E_c. We must account for two effects: First, when all cells are tightly packed, the elasticity of each cell is related to its internal pressure[13], i.e. the osmotic pressure difference $\Pi_i - \Pi_e$. Thus, as GIP increases, the elastic resistance imposed by neighboring cells will also increase, and the cells will progressively become stiffer. Second, at lower cell densities (prior to becoming completely packed) some of the mechanical pressure will deform cells, until the density reaches a maximum. Taking these two factors together, to a first approximation, we hypothesize that $E_c = (\Pi_i - \Pi_e)\,(\rho(P) - \rho_c)\,/\rho_m$, where $\rho(P)$ is the pressure-dependence of cell density, ρ_c is the cell density at confluence, and ρ_m is the maximum cell density.

To evaluate how cell density depends on external pressure, we consider a volume V_0 filled with cells, occupying a volume V_c, and culture medium, occupying a volume V_m, such that $V_0 = V_c + V_m$. By definition, $\rho = 1/V_0$. We found that under confinement, cell volume is not strongly affected by growth-induced pressure. Therefore, if we compress a box of volume V_0 (leading to an increase in cell density), only V_m will decrease. The culture medium volume decreases because it is displaced by an increasing number of cells that are deforming at fixed volume. We hypothesize, as above, that cell deformability is $\Pi_i - \Pi_e$, such that:

$$\frac{\partial_P V_m}{V_m} = -\frac{1}{\Pi_i - \Pi_e} \tag{14}$$

where $P = \Pi_i - \Pi_0$ is the growth-induced pressure. We take the derivative of $\rho(P)$ and get the following differential equation describing the change in cell density as a function of P:

$$\partial_P \rho/\rho_m = \frac{1}{\Pi_i - \Pi_e} \rho/\rho_m \left(1 - \rho/\rho_m\right) \tag{15}$$

Eq. 15 has a sigmoidal solution:

$$\frac{\rho}{\rho_m} = \frac{1}{1 + \exp\left(-P/\left(\Pi_i - \Pi_e\right)\right)} + \left(\frac{\rho_c}{\rho_m} - \frac{1}{2}\right) \tag{16}$$

where ρ_c is the cell density when the cells are at confluence. **We posit that, after cell confluence is reached, the threshold pressure needed to further expand the cell wall increases as as a function of the compressive stress imposed by the surroundings**:

- Before confluence, this threshold pressure is the nominal turgor pressure P_t
- After confluence, the threshold pressure is increased by the additional stress required to deform the elastic surroundings, $E_{\mathrm{eq}}\delta V/V_{\mathrm{confluence}}$

where $V_{\mathrm{confluence}}$ is the total cell volume when confluence is reached. Note that this is conceptually similar to increasing cell wall elasticity. The extra compressive stress $P = E_{\mathrm{eq}}\delta V/V_{\mathrm{confluence}}$, that needs to be overcome to continue to expand in volume, is the growth-induced pressure: the larger the volume expansion δV is, the larger P becomes.

c. Feedback: inhibition of protein production (k_{prod}) by macromolecular crowding. As cell volume expansion becomes inhibited due to confinement, both osmolarity and macromolecular crowding increase. Our data indicate that protein production is diffusion-limited and decreases as macromolecular crowding increases (Fig 2d). We incorporated this feedback into our model, with the form:

$$k_{\mathrm{prod}} = k_0 \exp\left(-\xi c_r v_r\right) \tag{17}$$

where the protein production rate decreases, similarly to Eq. 11, as macromolecular crowding increases c_r (v_r corresponds to the volume occupied by a single crowder, see above).

d. Calibration of model parameters. This model has a large number of parameters: k_0, ξ and $c_r^0 v_r$ that define the production rate and its dependence on macromolecular crowding, ρ_c/ρ_m related to the definition of the cell elasticity, E_{PDMS}, the surrounding elasticity, Π_e and Π_0, the external and internal control osmotic pressure, and P_t the turgor pressure.

In the following, we describe the experimental calibration of all of these parameters (except P_t, which is described in the next section):

- Growth parameters: $c_r^0 v_r$ has already been calibrated, see above. Moreover, since k_{prod} is proportional to the growth rate, we calibrated k_0 such that $k_{\mathrm{prod}} = k_0 \exp\left(-\xi c_r v_r\right) = 0.3\ \mathrm{h}^{-1}$, which corresponds to the unconfined growth rate. Concerning ξ, we used the fact that P_c was inversely proportional to the size of the diffusing probe s, leading to $\xi \propto s$. Using the ξ_{40} value measured for the diffusion of 40nm-GEMs, and the observed limiting size of 92 nm (Fig. 3b), this gives $\xi = 92\,\xi_{40}/40 = 17 \pm 5.5$. This value led to $P_c \sim 0.28$ MPa, in excellent agreement with experimental data (Fig. 4b).
- ρ_c/ρ_m was calculated from cell number data (Fig. 4d), where we found that confluence was reached at about 40% of final cell number, leading to $\rho_c/\rho_m \sim 0.4$, consistent with previous data (see Fig. S2C from [4]).
- $E_{\mathrm{PDMS}} = 0.8 \pm 0.1$ MPa was calibrated by measuring the deformation of the chamber with a defined hydrostatic pressure.
- We measured the osmolarity of SCD medium at 30^oC, Π_e, using an osmometer, and found $\Pi_e = 0.63 \pm 0.05$ MPa.
- As described previously, we fitted the dependence of nuclear volume on GIP to estimate the nominal intracellular osmotic pressure, $\Pi_0 = 0.95 \pm 0.05$ MPa.

- Calibration of the turgor pressure was a complex process, requiring a combination of electron microscopy, AFM, and laser ablation (details below). After careful evaluation, we found $P_t = 0.05 \pm 0.02$ MPa.

Important note on $\Delta\Pi$ *vs.* P_t:
We do not find, as often assumed, that the osmotic pressure difference is equal to the turgor pressure, but instead that $\Delta\Pi = \Pi_0 - \Pi_e > P_t$. This result is not inconsistent, and actually points to common misconceptions made in the evaluation of these parameters in the literature. In fact, during rapid growth, the continual increase in cell volume leads to a pressure loss. This pressure reduction effect is known as the suction pressure. Thus, the pressure change is written: $\Delta\Pi = P_t + P_s$, where P_s is the suction pressure, corresponding to the pressure loss through water influx into the cell as cell volume expands. In the limit where cell volume cannot increase, the osmotic pressure difference is exactly the same as the turgor pressure. However, if cell volume is increasing, $\Delta\Pi > P_t$. From our measurements, we estimate the suction pressure to be $P_s \sim 0.27$ MPa. Does this value make sense? We were unable to find values in the literature, but we can estimate a reasonable value from known properties of *S. cerevisiae*. We denote R_h as the hydraulic resistance of the cell wall, and get $P_s \sim R_h J$, where J corresponds to the flow of water, which is approximately the same as the cell volume expansion rate. Hydraulic resistance, R_h, is approximately $\sim 1/SL_p$ [14], where S is the surface area of the cell membrane and L_p is the membrane permeability. $L_p \sim 10^{-14}$m/s/Pa has been measured for plant cells [15], which have a thick wall like *S. cerevisiae*, and so it is reasonable to guess that these values could be similar. With the known surface area of a yeast cell at $S \sim 3.10^{-11}\text{m}^2$, this leads to an estimate of $P_s \sim J/SL_p \sim 0.25$ MPa for budding yeast. This value is very close to our estimation of P_s. Note that these values are consistent with previous observations in *S.cerevisiae* in which the authors found that $P_t \sim 0.05$ MPa when cells were growing, and $P_t \sim 0.25$ MPa for stationary cells[16]. In the model, we considered that $P_s \sim 0.25$ MPa was constant and did not depend on GIP.

Using all these parameters, we can predict how growth rate, cell number and GIP should vary during growth in confinement. We found that our model predicted our experimental observations remarkably well. This suggests, as discussed in the manuscript, that it is not necessary to invoke a specific biological adaptation through stress pathway signaling to explain the changes in protein production and proliferation that we observe during growth in confinement.

I. Measurement of turgor pressure through laser ablation, AFM and electronic microscopy.

We undertook a series of three experiments to determine cell wall elasticity and thickness, and turgor pressure. Fig. S12 shows examples of the data.

a. Laser ablation experiments to deflate a cell and to measure a function of turgor pressure and cell wall elasticity. By shooting the border of the cell with a laser, we create a hole in the cell, leading to efflux of cellular contents and deflation owing to loss of turgor and relaxation of cell wall components. Denoting E the cell wall elasticity, ν the Poisson ratio, h the cell wall thickness, $\Delta P = P_t$ the loss of pressure, and R_1 (R_0) the initial (final) radius of the cell, we found:

$$\Delta P = P_t = \frac{R_1 - R_0}{R_1}\frac{h}{R_1}\frac{2E}{1-\nu} \tag{18}$$

Experiments showed a deflation $1 - R_0/R_1 = 0.21 \pm 0.06$ (Fig. S12a).

b. Transmission electron microscopy to determine cell wall thickness. High resolution TEM images were acquired to estimate cell wall thickness. While precise measurement is difficult due to the fact that we do not really know where we cut in the cell, averaging over multiple measurements we estimate cell wall thickness to be $h \sim 0.13\mu m$ (Fig. S12b).

c. Atomic force microscopy as an orthogonal method to measure a function of turgor pressure and cell wall elasticity. Recent work from the group of A. Boudaoud investigated the use of AFM as a means to indent a pressurized shell [13]. Two regimes were identified: a small indentation regime where both internal pressure and cell wall elasticity are measured in a coupled way, and a large indentation regime, largely independent of cell wall elasticity, probing internal pressure only. We find that the large indentation regime is impossible to achieve for our cells because the probe usually ruptures the cell wall. Small indentation was however possible, and led to the measurement of the effective spring constant of the cell wall $k \sim 0.15$ N/m (Fig. S12c).

Theoretically, for small indentation, the authors derived a relationship between the effective spring constant of the cell wall k and the mechanical properties of the cell (formula 3.6 in their paper). This formula is a function of both P_t and E. Replacing E, we can estimate P_t:

$$P_t = \frac{\sqrt{3\left(1-\nu^2\right)}}{1-\nu}\frac{R_1-R_0}{R_1}\frac{k}{\pi h f(\tau)} \tag{19}$$

where:

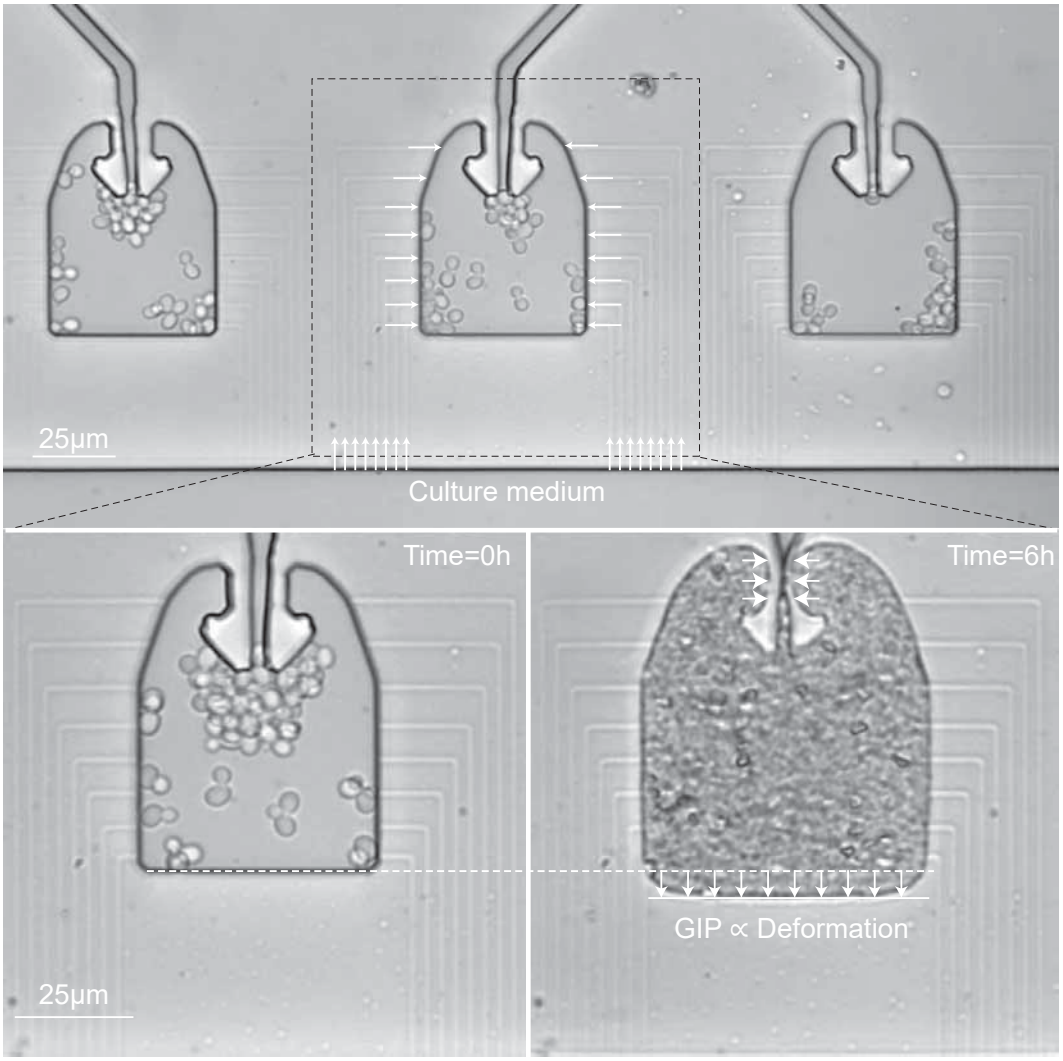
$$\tau = \frac{\sqrt{\left(3\left(1-\nu^2\right)\right.}}{1-\nu}\frac{R_1-R_0}{R_1}\frac{R_1}{h} \tag{20}$$

and $f(\tau)$

$$f(\tau) = \frac{\sqrt{\tau^2-1}}{\operatorname{arctanh}\sqrt{1-\tau^{-2}}} \tag{21}$$

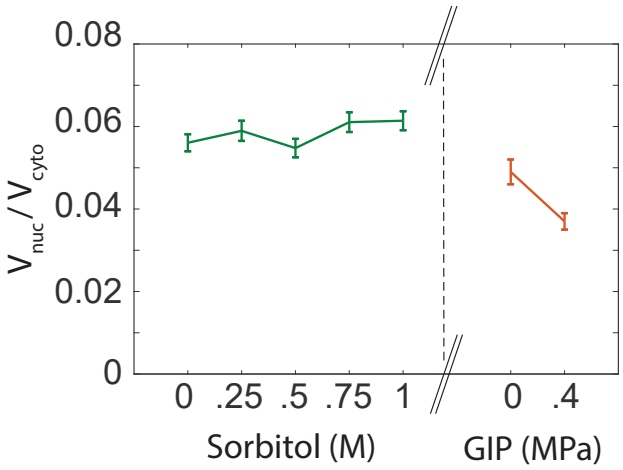
d. Extracting P_t. Using Eqs. 18 and 19 along with the measurement of cell wall thickness h, we were able to extract both the cell wall elasticity (assuming that $\nu \sim 0$) to be $E \sim 2.5$ MPa and the turgor pressure to be $P_t \sim 0.05$ MPa. We used this parameter in the theoretical prediction of experimental data (see above).

[1] Morgan Delarue, Gregory Poterewicz, Ori Hoxha, Jessica Choi, Wonjung Yoo, Jona Kayser, Liam Holt, and Oskar Hallatschek. Scwish network is essential for survival under mechanical pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51):13465–13470, 2017.
[2] Ivo F Sbalzarini and Petros Koumoutsakos. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *Journal of structural biology*, 151(2):182–195, 2005.
[3] Janice Griffith, Muriel Mari, Ann De Mazière, and Fulvio Reggiori. A cryosectioning procedure for the ultrastructural analysis and the immunogold labelling of yeast saccharomyces cerevisiae. *Traffic*, 9(7):1060–1072, 2008.
[4] Morgan Delarue, Jörn Hartung, Carl Schreck, Pawel Gniewek, Lucy Hu, Stephan Herminghaus, and Oskar Hallatschek. Self-driven jamming in growing microbial populations. *Nature physics*, 12(8):762–766, 2016.
[5] Takamitsu J Morikawa, Hideaki Fujita, Akira Kitamura, Takashi Horio, Johtaro Yamamoto, Masataka Kinjo, Akira Sasaki, Hiroaki Machiyama, Keiko Yoshizawa, Taro Ichimura, et al. Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it. *Scientific reports*, 6(1):1–13, 2016.
[6] Moshe Kafri, Eyal Metzl-Raz, Felix Jonas, and Naama Barkai. Rethinking cell growth models. *FEMS yeast research*, 16(7), 2016.

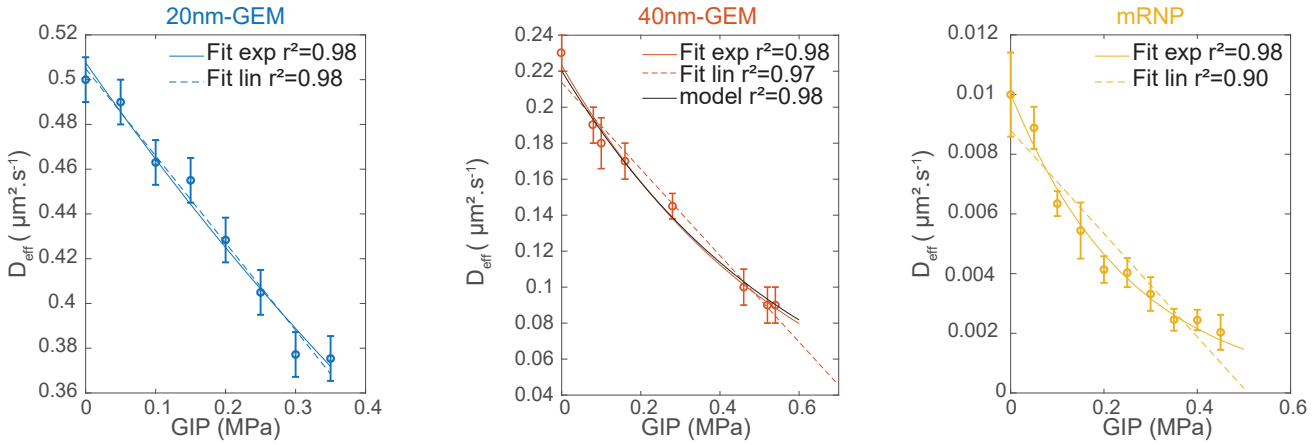


Supplementary figure S 1. **Device used in the microfluidic experiments.** Cells are loaded in a culture chamber connected on its sides to narrow channels that are used to set the chemical environment. Confined growth lead to the buildup of GIP, which is measured through the deformation of the elastic chamber.

[7] Morgan Delarue, Gregory P Brittingham, Stefan Pfeffer, IV Surovtsev, S Pinglay, KJ Kennedy, M Schaffer, JI Gutierrez, D Sang, G Poterewicz, et al. mtorc1 controls phase separation and the biophysical properties of the cytoplasm by tuning crowding. *Cell*, 174(2):338–349, 2018.
[8] Morrel H Cohen and David Turnbull. Molecular transport in liquids and glasses. *The Journal of Chemical Physics*, 31(5):1164–1169, 1959.
[9] Agnès Miermont, François Waharte, Shiqiong Hu, Megan Nicole McClean, Samuel Bottani, Sébastien Léon, and Pascal Hersen. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14):5725–5730, 2013.
[10] Andrea K Bryan, Alexi Goranov, Angelika Amon, and Scott R Manalis. Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3):999–1004, 2010.
[11] Enrique R Rojas, Kerwyn Casey Huang, and Julie A Theriot. Homeostatic cell growth is accomplished mechanically through membrane tension inhibition of cell-wall synthesis. *Cell systems*, 5(6):578–590, 2017.
[12] Peter Albersheim, Alan Darvill, Keith Roberts, Ron Sederoff, and Andrew Staehelin. *Plant cell walls*. Garland Science, 2010.
[13] Dominic Vella, Amin Ajdari, Ashkan Vaziri, and Arezki Boudaoud. The indentation of pressurized elastic shells: from polymeric capsules to yeast cells. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(68):448–455, 2012.

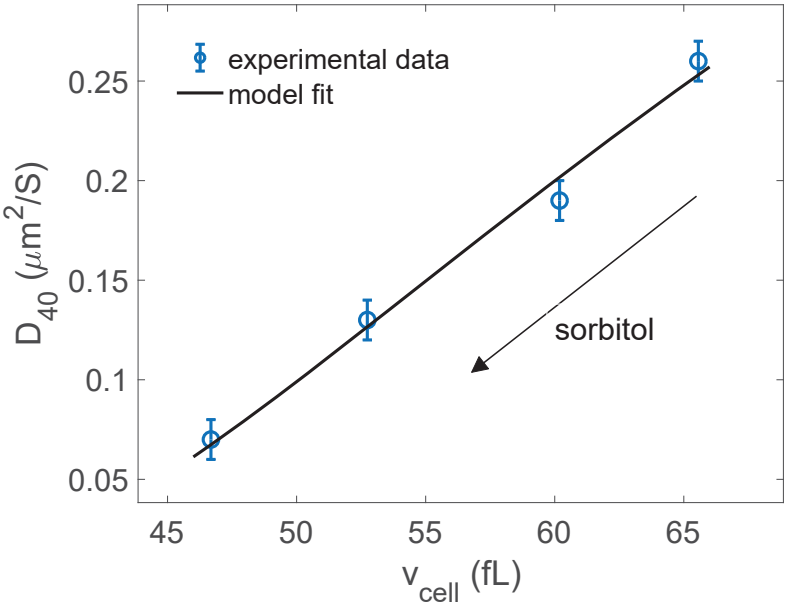


Supplementary figure S 2. **Impact of osmotic shock.** Ratio of nucleus and cytoplasm volume under osmotic shock and growth induced pressure.

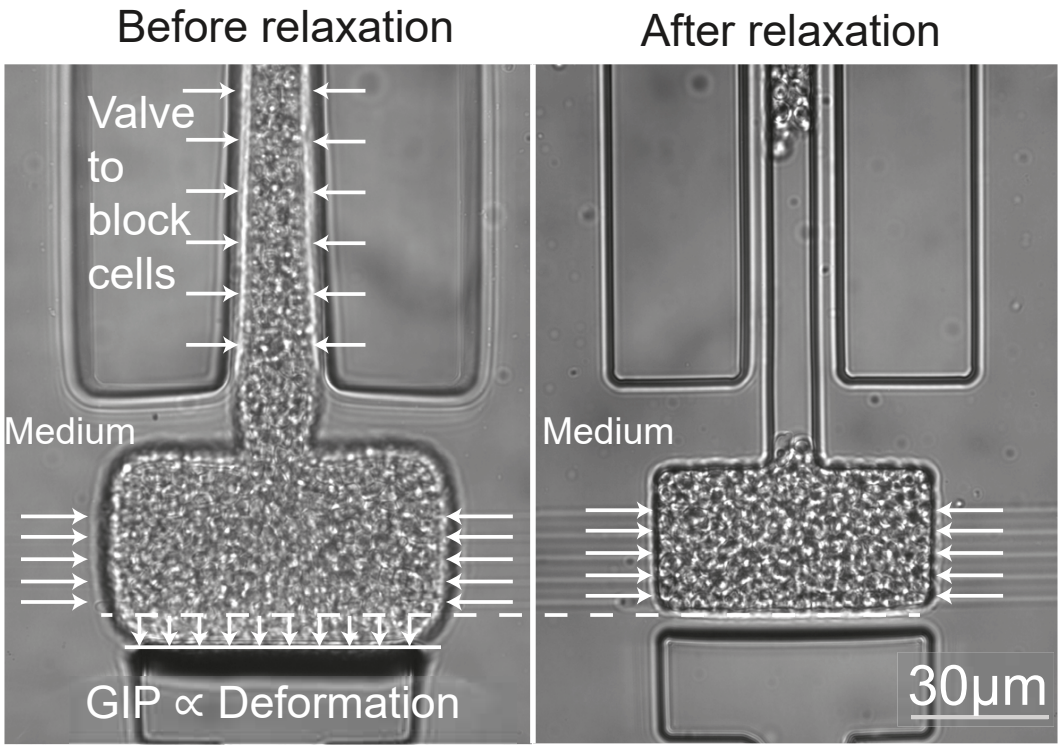


Supplementary figure S 3. **Linear and exponential fits on the diffusion as a function of GIP data.** The score for each fit is presented. We superimposed the prediction of diffusion as a function of GIP for the 40nm-GEMs, as well as the corresponding score.

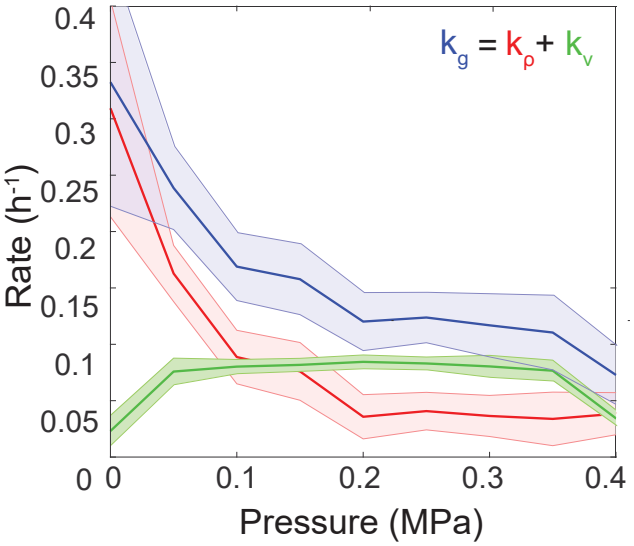
[14] Edda Klipp, Bodil Nordlander, Roland Krüger, Peter Gennemark, and Stefan Hohmann. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nature biotechnology*, 23(8):975, 2005.
[15] Kaare H Jensen and Maciej A Zwieniecki. Physical limits to leaf size in tall trees. *Physical review letters*, 110(1):018104, 2013.
[16] IM De Mara on, Pierre-André Marechal, and Patrick Gervais. Passive response of saccharomyces cerevisiae to osmotic shifts: cell volume variations depending on the physiological state. *Biochemical and biophysical research communications*, 227:519–523, 1996.



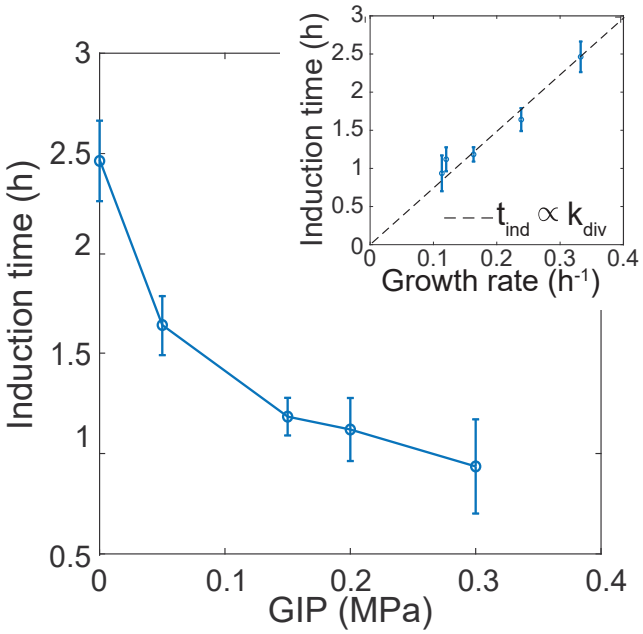
Supplementary figure S 4. **40nm-GEMs diffusion as a function of cell volume.** Model fit (Eq. (13)) of the experimental data to extract $\xi_{40} = 7.4 \pm 2.5$ ($r^2 = 0.99$).



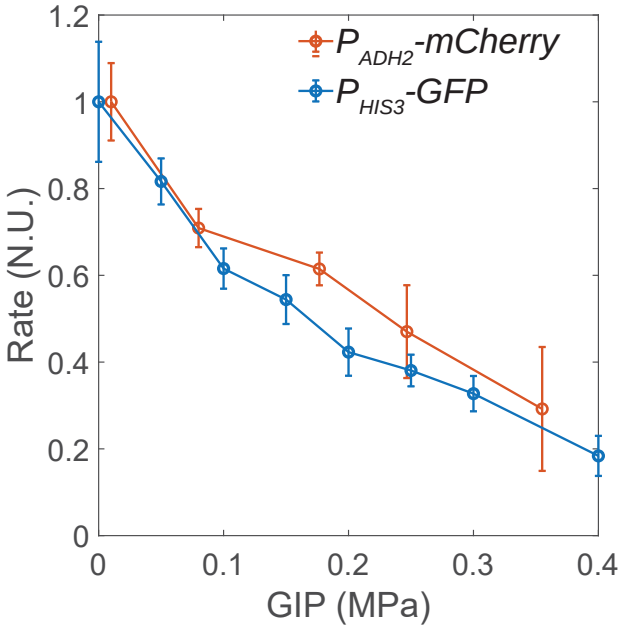
Supplementary figure S 5. **Device to relax mechanical stress, similar as in[1].** The culture chamber is, similar to the device presented in Fig. S1, connected to a set of narrow channels to set the chemical environment. A valve is actuated to confine the cell population and allow it to build up GIP. We estimate GIP by measuring the deformation of the PDMS membrane. Opening of the valve leads to a relaxation of GIP.



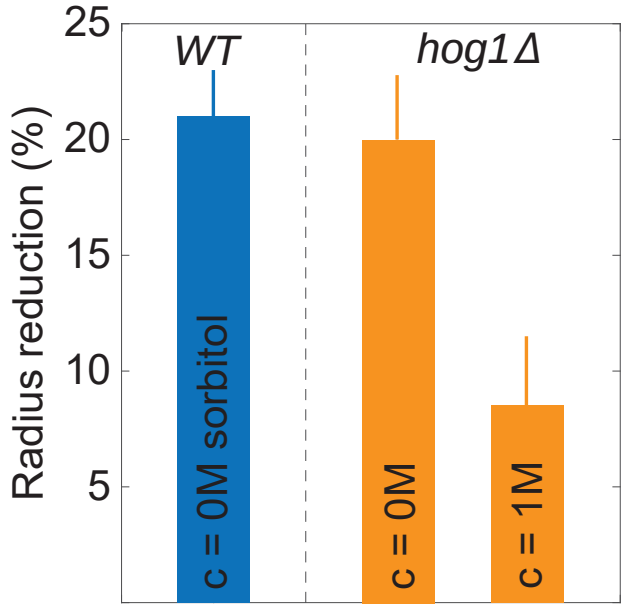
Supplementary figure S 6. **Contribution of density and chamber volume change in the growth rate.** For simplicity, we denoted k_g as the growth rate, $k_\rho = \partial_t \rho / \rho$ as the contribution of cell density ρ to growth rate, and $k_V = \partial_P V / V \partial_t P$ the contribution of the volume of the chamber V.



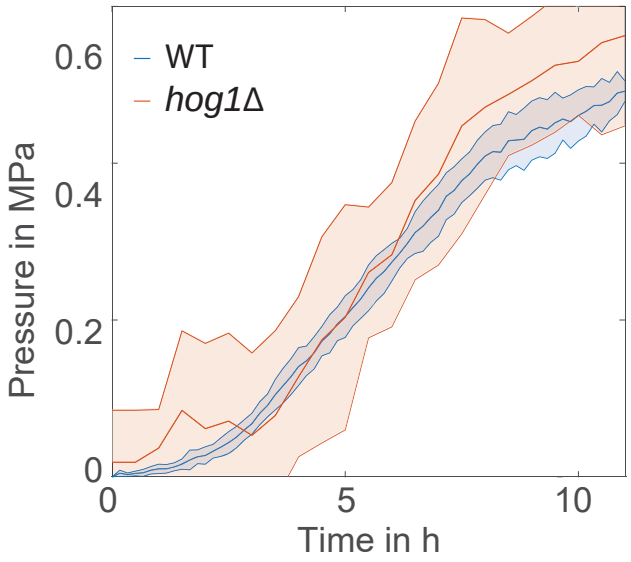
Supplementary figure S 7. **Induction time of P_{ADH2}-*mCherry* as a function of time.**



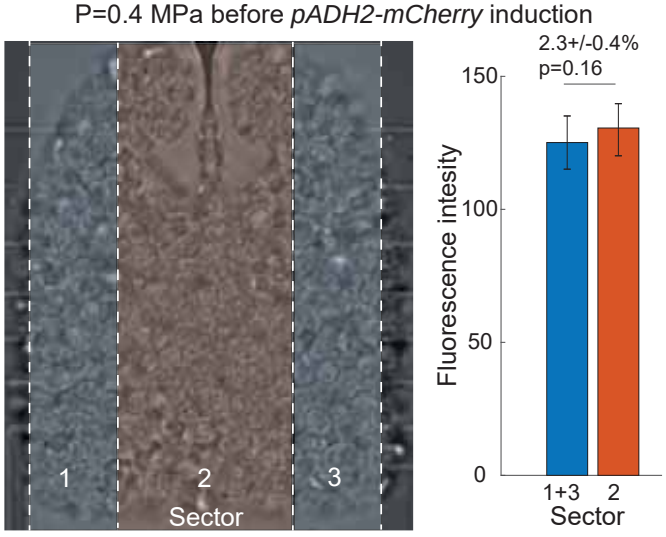
Supplementary figure S 8. **Comparison of the effect of GIP on protein production rate for P_{ADH2}-*mCherry* and P_{HIS3}-*GFP***



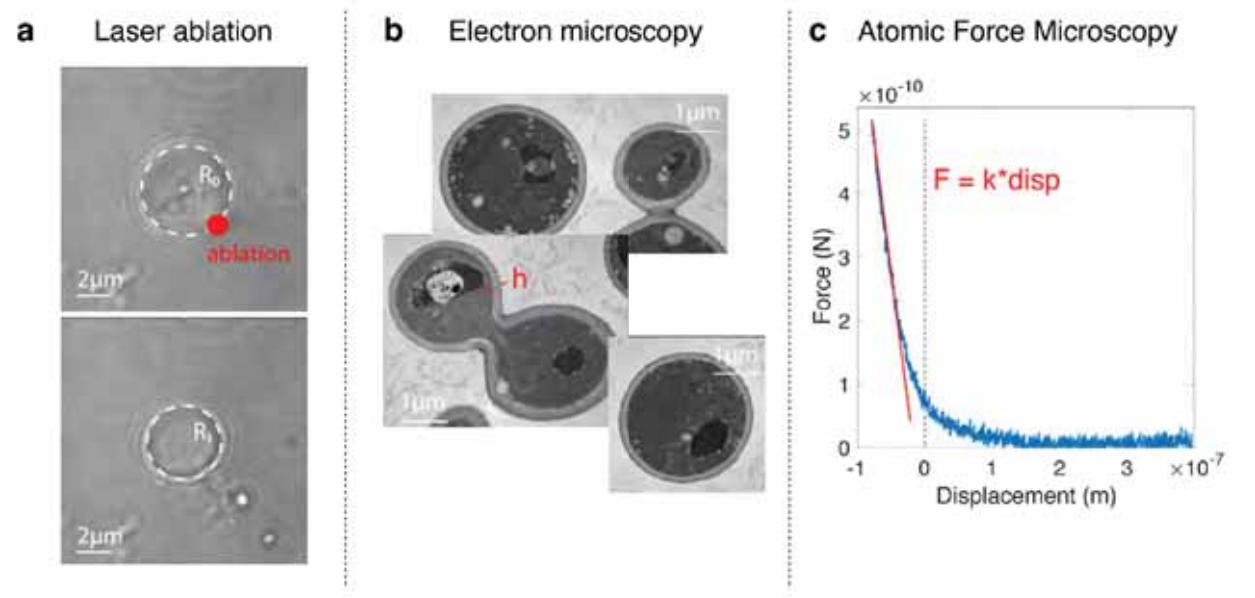
Supplementary figure S 9. **Laser ablation experiments (see also Fig. S12 and section J above). Cells were punctured with a laser, resulting in a decrease in cell radius proportional to turgor pressure. The similar decrease in radius of WT and *hog1*Δ cells indicates that, absent osmotic perturbation, these cells develop similar amounts of turgor pressure. The decrease in radius of osmotically compressed (c = 1M sorbitol) *hog1*Δ cells indicates that these cells are still pressurized, albeit to a reduced extent.**



Supplementary figure S 10. **Growth induced pressure as a function of time for WT cells and *hog1*Δ cells.**



Supplementary figure S 11. **Measurement of the fluorescence intensity in the center *versus* the edge of the chamber prior to induction of *pADH2-mCherry* shows an insignificant (p-value = 0.16) 2.3% difference.**



Supplementary figure S 12. **Calibration of turgor pressure. a**. We used a high-intensity laser pulse to make a hole in a cell, forcing its deflation. The cell radius changes as a function of turgor pressure, cell wall elasticity, and thickness of the cell wall. **b**. We used transmission electron microscopy to measure the cell wall thickness. **c**. We performed AFM experiments, using small deformations (below 0.2 μm) to extract the effective elasticity of the cell. This elasticity provided a mathematical function of turgor pressure, cell wall elasticity, and cell wall thickness.

Annexe C

Annexe : article 2

ADVANCED BIOLOGY
www.advanced-bio.com

Microwell Array Based Opto-Electrochemical Detections Revealing Co-Adaptation of Rheological Properties and Oxygen Metabolism in Budding Yeast

Venkata Suresh Vajrala, Baptiste Alric, Adrian Laborde, Camille Colin, Emmanuel Suraniti, Pierre Temple-Boyer, Stephane Arbault, Morgan Delarue, and Jérôme Launay**

Microdevices composed of microwell arrays integrating nanoelectrodes (OptoElecWell) are developed to achieve dual high-resolution optical and electrochemical detections on single *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. Each array consists of 1.6×10^5 microwells measuring 8 µm in diameter and 5 µm height, with a platinum nanoring electrode for in situ electrochemistry, all integrated on a transparent thin wafer for further high-resolution live-cell imaging. After optimizing the filling rate, 32% of cells are effectively trapped within microwells. This allows to analyse *S. cerevisiae* metabolism associated with basal respiration while simultaneously measuring optically other cellular parameters. In this study, the impact of glucose concentration on respiration and intracellular rheology is focused. It is found that while the oxygen uptake rate decreases with increasing glucose concentration, diffusion of tracer nanoparticles increases. The OptoElecWell-based respiration methodology provides similar results compared to the commercial gold-standard Seahorse XF analyzer, while using 20 times fewer biological samples, paving the way to achieve single cell metabolomics. In addition, it facilitates an optical route to monitor the contents within single cells. The proposed device, in combination with the dual detection analysis, opens up new avenues for measuring cellular metabolism, and relating it to cellular physiological indicators at single cell level.

1. Introduction

Many physiological and molecular functions happening in cells are the sum of sequential processes, where nearly every biochemical reaction is a reaction–diffusion process involving the diffusive flux of biomolecules to cellular active sites.[1] Unlike usual soft materials, the cells deal with nonequilibrium active forces and are able to transform cellular external cues into biochemical signals.[2–4] On the contrary, cells are capable of using biochemical signals to modify their viscoelastic properties, not only at the plasma membrane level, but also around the nucleus, within the intracellular organelles and the cytoplasm.[5–8] As such, the interplay between the cellular rheological and metabolic properties appear extremely important in overall functioning, through numerous pathways, in response to changes of their physicochemical environment. For example, the regulation of adenosine triphosphate (ATP), cellular energy derived from digested glucose and consumed oxygen via mitochondrial oxidative phosphorylation OXPHOS, is linked to cellular membrane stiffness fluctuations and other cellular rheological changes.[9–12] In this regard, there has been a great deal of interest to understand how the rates of cellular respiratory metabolism (OXPHOS activity) is related to the intracellular rheological parameters and molecular diffusion within the cells. In order to have a comprehensive knowledge on such dynamic relationships, there is a need for integrated multiparametric detection systems that can offer simultaneous monitoring of biochemical and biophysical properties of cells. The main focus of the presented research work concerns a novel dual-detection approach for simultaneous monitoring of average cellular oxygen consumption rate (OCR) and cellular rheological properties at single cell level.

Several electrochemical and optical sensor platforms are currently available for cellular respiration monitoring OCR, such as Clark-type electrodes in suspended biological samples,[13,14] or fluorescent probes in plated cultured cells.[15,16] In presence

Dr. V. S. Vajrala, B. Alric, A. Laborde, Dr. P. Temple-Boyer, Dr. M. Delarue, Dr. J. Launay
CNRS
LAAS
7 avenue du colonel Roche, Toulouse F-31400, France
E-mail: morgan.delarue@laas.fr; jerome.launay@laas.fr
B. Alric, A. Laborde, Dr. J. Launay
Université de Toulouse
UPS, LAAS, Toulouse F-31400, France
Dr. C. Colin, Dr. E. Suraniti, Dr. S. Arbault
Univ. Bordeaux
ISM
CNRS UMR 5255, INP Bordeaux, Pessac 33607, France
The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under https://doi.org/10.1002/adbi.202100484.

DOI: 10.1002/adbi.202100484

 © 2021 Wiley-VCH GmbH

of specific drugs (metabolic uncouplers and inhibitors), oxygen consumption experiments can determine basal and maximal cellular respiratory capacity and the estimation of substrate effects, among other parameters.[17–19] Electrochemical methods, in particular ultramicroelectrodes (UME) and/or nanoelectrodes, can sense the concentration gradients of redox species up to few pico-liter volume range.[20–23] The diffusion volume probed by a nanoelectrode would indeed be adequate for sensing the microenvironment of a single cell, where they offer steady-state diffusion limited currents and short response times.[23–28] However, this approach is still been faced with challenges in dealing with the low throughput owing to the manual positioning of the electrode near the cell and UME spatial coverage over the cell, i.e., partial detection of targeted cellular events due to lateral diffusion phenomenon. To overcome these limitations, we have recently developed a microwell array integrated with recessed ring-type micro/nanoelectrodes (RME/RNE).[29,30] A functional and intricate integration of these RNE-based devices within microwells allowed us to entrap individual mitochondria in a high-throughput manner, and followed their respiration under several metabolic activation and inhibition conditions.

In parallel, high-resolution fluorescence based single particle tracking (SPT) techniques have been widely used in the field of cell biology as a means of unravelling diffusion dynamics of biomolecules and tracers within cells, at nanometric spatial resolution.[31–33] Many fluorescent probes are available right now, where typically the probe is attached to the molecule of interest, such as an organelle, virus-like particles, or a receptor to track the individual dynamics.[34,35] These tracer nanoparticles move within the cells and enable the study of cellular biophysical properties under different dynamic environments. Various groups have studied the motion of nonbiological nanoparticles in cells, but typically, these techniques are labor-intensive and perturb the cellular natural behavior due to their nonbiocompatibility or bulkier sizes. We recently developed genetically encoded multimeric nanoparticles (GEMs) which are bright 40 nm tracer particles of a defined shape, and relatively impervious to specific interactions with in the cell.[36,37] Using this novel methodology, we are able to measure the rheological parameters of a cell at the single cell level and without the need to inject fluorescent probes.

In this work, we developed a novel microwell array device which allows to intimately blend the electrochemical and high-resolution optical sensing techniques, to achieve dual-detection of entrapped cells, in an orderly fashion, and their responses over time. Such systems can allow simultaneous dual optical and electrochemical measurements to shed light on the intricate cross-relationships between cellular internal dynamics of biomolecular diffusion and OXPHOS based energy metabolism. We present a new generation of very well ordered microwell array device (OptoElecWell) with dimensions optimized for the study of the model fungus *Saccharomyces cerevisiae*, wherein the microwells (8 μm d × 5 μm h) are connected to platinum (Pt) nanoring type working electrode, supported by a very thin (≈170 μm) glass substrate, used as a platform for monitoring both cellular oxygen consumption and high-resolution nanoparticle tracking at single cell level.

We first fabricated the microwell array chip, made up of "glass (170 μm)/silicon dioxide SiO_2 (2.5 μm)/titanium Ti (20 nm)/platinum Pt (200 nm)/titanium Ti (20 nm)/silicon dioxide SiO_2 (2.5 μm)" sandwich stack using chemical vapor deposition, reactive ion etching, and glass polishing techniques. Subsequently, the optical and electrochemical characterization of the microwell array were performed to realize the best performing conditions for, (i) Pt nanoring working electrode, (ii) filling of wells with yeast cells, and (iii) nanoparticle tracking within yeast cells entrapped within microwells. Later, we demonstrated the integrated dual-detection approach for simultaneous electroanalysis of cellular oxygen consumption and fluorescence-based single particle diffusion measurements within cells. The simultaneous SPT and OCR measurements led to the counter-intuitive discovery of a coadaptation of OXPHOS and rheological properties: as glucose concentration decreases, OXPHOS and supposedly ATP production increases, while diffusion decreases.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Yeast Cells and GEMs Expression

Budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, derived from BY4742 strain) cells, labeled on their histone by a mCherry tag to visualize the nucleus and express genetically encoded multimeric nanoparticles – GEMs[37] (courtesy of L. Holt) were cultured on synthetic complete medium agar. They were resuspended 24 h before experiments in liquid medium with different glucose concentration (0.5, 1, and 2 g mL^{-1}), and when necessary were diluted in fresh buffer to 0.5 OD (optical density) at the beginning of the measurement.

2.2. Oxygen Consumption Rates Measurements Using Seahorse XF Bioanalyzer

Yeast (*S. cerevisiae*) oxygen consumption rates were measured using a SeaHorse XF 24 Analyzer.[16] The experiment was performed in yeast cell culture solution containing 1.5×10^5 cells per well of 24-well plates (600 μL). Basal respiration conditions were measured for cells in the presence of three extracellular glucose concentrations, 0.5%, 1%, and 2% w/v.

2.3. Microfabrication of OptoElecWell Device

The design and fabrication of the microwell array reported here is inspired from the previous works where the first generation of OptoElecWell is reported and its design by multiphysics simulation, manufacturing process, and characterization is discussed.[30,38]

Photomask designs for the microwell arrays and electrodes (e1 and e2), as shown in **Figure 1**b,c, were first drawn in CleWin software and later printed on high-resolution glass substrates. Starting from B33 glass substrate (500 μm thick), three deposition steps were conducted in a row, the first step being 2.5 μm thick SiO_2 film by plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD). This step was followed by the deposition of 200 nm platinum layer by evaporation while using two 20 nm titanium interfacial layers, and another 2.5 μm thick PECVD SiO_2

© 2021 Wiley-VCH GmbH

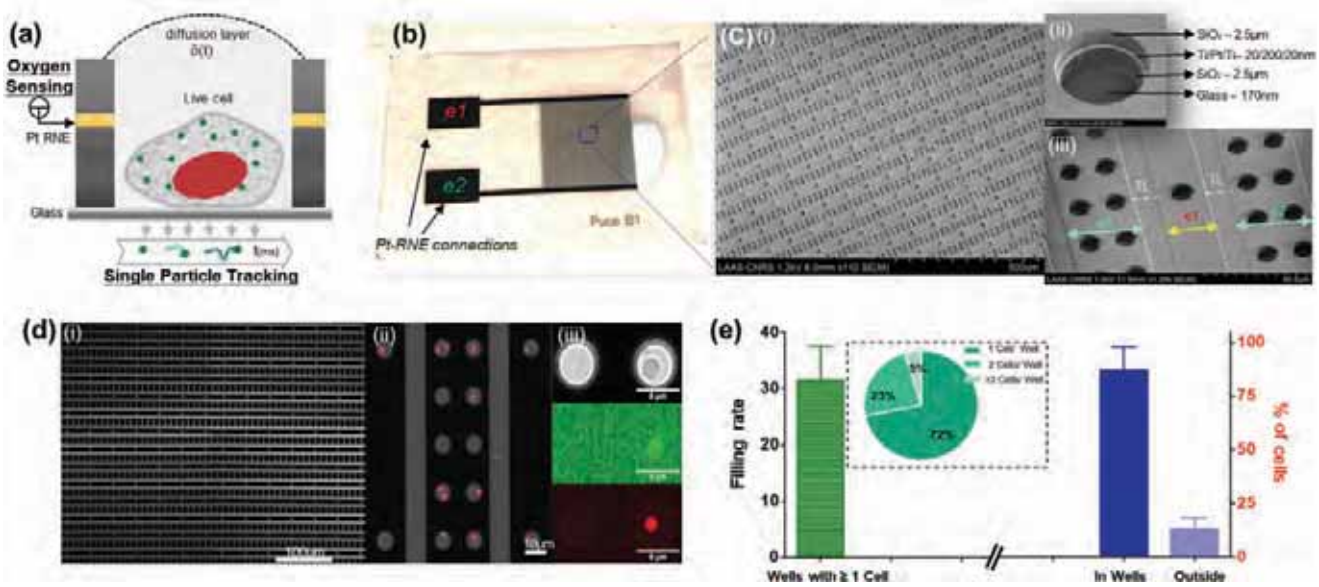


Figure 1. a) Schematic view of the opto-electrochemical (dual) detection using OptoElecWell array to monitor yeast cellular metabolic responses; b) Photograph of the OptoElecWell chip having 1.6×10^5 microwells. Pt-RNE means Platinum ring type nanoelectrodes; c) Electron microscopic images of the device, showing microwell arrays (e1 and e2) with a mean well dimensions of 8 µm ***d*** and 5 µm ***h***, on a thin glass substrate having thickness around 170 µm. e1 and e2 represents the columns (subsets) of microwells within the array having 60 µm and 15 µm inter-well array distance respectively. In between the columns there exists a transparent layer (TL). d) (i) The representative micrograph (overlay of a bright field and a fluorescence image in red) of yeast cells entrapped in OptoElecWells array after seeding with cells that were stained with nucleus tag (histone tagged with mCherry fluorophore); (ii) Zoom-in the area from (i), showing the trapped singlet and multiplet of cells in each microwell; (iii) Microscopic pictures of yeast cells showing nucleus and 40 nm GEMs expressed in a single yeast cell within a microwell. The images were taken through the transparent microwell array chip using inverted fluorescence microscope at 5× and 20× magnifications; e) The green bar (left) depicting the percentage of the filling rate within microwell array. The Pie chart represents the measured distribution of cell occupancy per well. The blue coloured bar graph (right) shows the percentage of cells found within the microwells versus outside the wells.

layer to form a SiO_2/Ti/Pt/Ti/SiO_2 stack. Next, the microwell array with integrated Pt-nanorings was created, through a patterned photoresist mask, where the whole stack (SiO_2/Ti/Pt/Ti/SiO_2) was etched using inductively coupled plasma reactive ion etching (ICP-RIE) with three different gaseous mixtures (carbon tetrafluoride, argon, sulfur hexafluoride and chlorine). Later, the electrical contacts of working electrodes e1 and e2 were established by exposing the platinum layer at selected areas using wet etching of SiO_2. Finally, in order to facilitate high-resolution optical measurements, the bottom surface of the BOROFLOAT® 33 glass wafer was carefully polished using Logitech PM5 lapper, where the wafer was lapped in between two counter-rotating cast plates using slurries consisting of different alumina abrasive grains with defined size distribution. First, the wafer thickness was reduced from 500 to 300 µm using alumina slurry with 20 µm grain size for 60 min. Later, the wafer was carefully polished with a slurry of 9 µm grain size, followed by another lapping step with 1 µm grain sized slurry, to obtain 170 µm thick wafer. Finally, the electrical contacts of e1 and e2 for performing electrochemistry were established by microsoldering technique using sliver epoxy silver paint.

2.4. On-Chip Dual Detection of Yeast Cell Metabolism

A plastic fluidic prototype system, supported by plastic screws and smooth silicone polymer pad was fabricated using micromilling process, to accommodate thin OptoElecWell array at the bottom. Yeast cells were immediately used for sample preparation after reaching the required OD. Just prior to use, the microwell array was cleaned carefully with deionized DI water and ethanol, followed by oxygen plasma treatment (Diener plasma 50W) for 2 min. The microwell array was then fixed at the bottom of fluidic system and 150 µL of yeast cells were added to the reservoir. Yeast cells were gently moved back and forth using pipette on microwell array surface, over 30 cycles, followed by a 10 min incubation to promote the sedimentation of cells in microwells. Later, the leftover cell suspension was removed by performing careful washings. Finally, 1 mL of aerated yeast buffer was injected into the fluid reservoir, and all three-electrode connections, along with the microscopy focus was established to analyze the cells in microwells.

2.5. Live Cell Imaging and Single Particle Tracking

All the experiments were carried out at 30 °C, on the stage of an inverted confocal microscope (Leica DMI 6000, Germany). Imaging was recorded on a scientific CMOS camera (Hamamatsu). Cell nuclei were monitored by taking pictures using mCherry fluorescence (laser at 561 nm wavelength). The intrinsic T-sapphire fluorescent protein (green) to image 40 nm GEMs at 488 nm wavelength and sampled at a rate of one image every 20 ms is targeted.

© 2021 Wiley-VCH GmbH

2.6. Electrochemical Characterization and Oxygen Consumption Monitoring

Electrochemical measurements were conducted at 30 °C, using silver/silver chloride (Ag/AgCl) reference (RE) and Pt-mesh counter electrodes (CE) connected to BioLogic potentiostat, equipped with ultralow current module. In this work, nanoelectrode array (e1) as the working electrode (WE) (Figure 1b,c) is used. The electrochemical activation and characterization of nanoring type, sandwiched Pt layer was done by performing a series of cyclic voltammograms CVs in 1 M sulfuric acid H_2SO_4 at 1 V s^{-1}. Continuous CV technique is used to monitor the cellular oxygen consumption at different metabolic stages (4 V s^{-1}, 20 s of relaxation gap between each scan). Carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, Sigma-Aldrich) and antimycin A (AMA, Sigma-Aldrich) solutions were prepared in the sample buffer at the following final concentrations: FCCP 1×10^{-6} M and AMA 10×10^{-6} M. The reductive current values of each scan at −0.7 V were recorded and processed by a Python program. Origin software was used to plot the data and perform statistical analyses.

2.7. Model for Oxygen Consumption Rate Monitoring Within OptoElecWell Device

We assumed that the oxygen consumption of a cell and the oxygen reduction on a recessed disk microelectrode[30] are similar. They both rely on the diffusion and concentration of oxygen available in the buffer, and according to the diffusion law applied to electrochemistry, the dissolved oxygen flux ϕ from the bulk solution to the cell surface is given by

$$\phi = D_{O2}\frac{C_{O2} - C_{O2}^{cell}}{\delta(t)} = D_{O2}\frac{C_{O2}^{RNE} - C_{O2}^{cell}}{d_{RNE}} \quad (1)$$

Where D_{O2} is the diffusion coefficient of dissolved oxygen, C_{O2}, C_{O2}^{RNE}, and C_{O2}^{cell} are the dissolved oxygen concentrations in the bulk solution, at the ring nanoelectrode surface and at the cell surface, d_{RNE} is the distance between the ring nanoelectrode and the cell, and $\delta(t)$ is the time-dependent diffusion layer thickness

$$\delta(t) = \sqrt{\pi D_{O2} t} \quad (2)$$

According to Equation (1) and (2), C_{O2}^{RNE} can be rewritten as

$$C_{O2}^{RNE} = C_{O2}^{cell} + \frac{d_{RNE}\left(C_{O2} - C_{O2}^{cell}\right)}{\sqrt{\pi D_{O2} t}} \quad (3)$$

In Equation (3), it should be noticed that C_{O2}^{cell} is representative of the cellular oxygen consumption and it depends on the glucose concentration in solution.[39,40] Since the dissolved oxygen reductive current i_{RNE} measured on the Pt ring nanoelectrode is proportional to C_{O2}^{RNE} and the OptoElecWell device was designed to prevent crosstalk between microwells,[30,41] the measured currents should follow temporal variations according to a "Cottrell-like relation."[42]

$$(-i_{measured}) = (-i_{final}) + \frac{K}{\sqrt{t}} \quad (4)$$

Where the final current i_{final} and the parameter K, directly proportional to the oxygen consumption rate, depends on the glucose concentration in solution.

2.8. Statistical Analysis

The oxygen reductive current data from cyclic voltammetric curves were procured and processed by custom-made python codes. Whereas, the tracking of individual GEM nanoparticles was performed with the Mosaic suite of FIJI assuming Brownian dynamics and analysed on home-made programs on Matlab, available on demand.[37] The end point measurements of cellular oxygen consumption rates were expressed as mean ± SD (n = 4) and the average mean square displacement of individual GEM particles were expressed as mean ± SEM (n = 700). The statistical analyses were performed by Origin software (OriginPro 8.5, USA) and all the conditions were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with t-test ($p < 0.05$), where ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ and NS = no significant difference. Pearson correlations (two-tailed) were performed at 95% confidence interval, and the respective correlation coefficient and R square values were indicated in the corresponding figure legend.

3. Results and Discussion

Over the years, we have designed different ring-type nanoelectrode (RNE) based microwell arrays.[30,38,43] We reported that the quality of electrochemical response of these arrays, which is the sum of electrochemical response of individual nanoring type microelectrodes, heavily relies on the distance between each microelectrode within the array and the number of microwells with biological species, i.e., active wells. In line with the dual-detection of cells, a nice compromise should be established so that the wells cannot be very close to each other (< 5 × radius of the well R), which further increases the crosstalk between each microwell, or not so far from each other (> 20 × R) so that it decreases the number of wells having cells and further impacts the optical throughput. In addition, few cells can also be located at the interwell surface area, which are optically untraceable, preventing the normalization and further complicating the sensing and metabolic interpretations. With this in mind and by considering all the constraints, we developed a novel microwell array (OptoElecWell) device (Figure 1), where 1.6×10^5 microwells having 8 µm diameter, 5 µm height, were arranged in a specific pattern such that there exists two different RNE well array zones, e1 and e2 with 60 and 15 µm interwell distances, respectively (Figure 1b,c). They were designed for the purpose of either connecting both RNEs together or individually addressing each electrode array to notably follow two electroactive species. In addition, we incorporated a transparent layer (TL, Figure 1) in between the columns of microwells to estimate the number of cells that are not entrapped in the wells.

© 2021 Wiley-VCH GmbH

3.1. Filling Rate, Monitoring, and Evaluation of Yeast Cells within OptoElecWell

The yeast cell array was prepared by dispersing the cell suspension in a fluid chamber that was carefully fitted on top of microwell array device. Oxygen plasma treated flat silicon surfaces favors fair immobilization of biological material, owing to the electrostatic interactions. Another advantage of plasma is that it remains a very simple surface modification strategy, where it enables the measurement of natural cell responses without the interference caused by complicated surface immobilization strategies. In this regard, we activated the OptoElecWell by treating the surface of array with oxygen plasma prior to cell injection. Cells were later loaded by dispersing a suspension of freshly cultured yeast cells and followed by careful washings. We used suspensions of 0.5 OD and observed that the cell concentration and washings could clearly affect the cell packing density (results not shown). Under optimized conditions, there were almost 32% of wells occupied by 1 or more cells and 75% within them were containing only one cell (Figure 1d,e). From both optical and electrochemical monitoring point of view, it is very important to know the total number cells, along with the distribution of cells per well. Additionally, the electrochemical monitoring does not only rely on the filling rate but also the estimation of interfering cells that are sedimented at the interwell surface (outside the wells); the lesser the better. We could estimate the percentage of total cells that were within the wells, being 87%, compared to the 13% of cells that were sedimented on the interwells surface area.

3.2. Electrochemical Characterization and Monitoring of Cellular Oxygen Consumption

We used in this study the electrode array (e1) having 1.7×10^4 microwells in total as a working electrode. We chose e1, with the interwell distance of 60 µm such that there will be minimal overlapping of diffusion layers with neighboring microelectrodes. The microwells with interwell distance of 15 µm (e2) were kept electrically neutral and used for optical monitoring of cells, to increase the optical throughput. The electrochemical performance of the nanoring-type, 200 nm thick platinum within the microwell array was first characterized by cyclic voltammetry in 1 M H_2SO_4 solution (potential scanned between –0.3 and 1.6 V), showing clear proton reduction and oxidation waves similar to the native solid Pt metal (**Figure 2**a). As a sampling method to sense local oxygen changes around the entrapped cells, within microwells, we chose continuous cyclic voltammetry over chronoamperometry. We noticed that under optimized conditions–higher scan rates and gaps between each scan (4 V s^{-1} and 20 s gap), CV allows to monitor the local chemical changes happening within the microwells, while allowing the oxygen concentration to get to the equilibrium before next measurement,[38] i.e., no competition between working electrode and yeast cells in terms of oxygen usage. We first investigated the oxygen sensing capacity of OptoElecWells by performing the electrochemical reduction of dissolved oxygen under different oxygen concentrations in yeast buffer using cyclic voltammetry at a scan rate of 4 V s^{-1}. The oxygen reduction peak current was detected around –0.7 V and

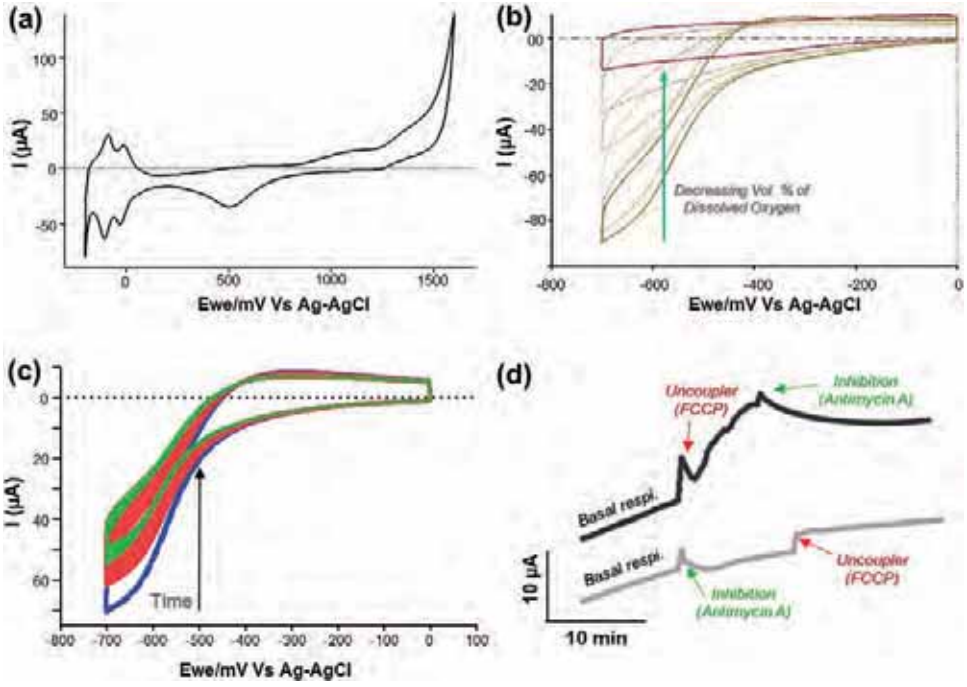


Figure 2. Electrochemical characterizations by cyclic voltammetry (CV) of the nanoelectrode based OptoElecWell device: a) Voltammogram (1 V s^{-1}) recorded in 1 M H_2SO_4 solution. b) Voltammograms (4 V s^{-1}) recorded in yeast buffer (pH 7.4) containing different oxygen concentrations. C) A continuous series of cyclic voltammograms depicting the electrochemical monitoring of the oxygen consumption by yeast cells under different metabolic states (Scan rate: 4 V s^{-1}, delay of 20 s between scans). d) Oxygen reductive peak current evolution biased at –0.7 V versus Ag/AgCl measured on a continuous series of CVs (Figure 2c), depicting the electrochemical monitoring of the oxygen consumption by yeast cells, followed by the additions of 1×10^{-6} M FCCP and 10×10^{-6} M Antimycin A. Ag/AgCl reference electrode and a platinum mesh as a counter electrode were used here.

© 2021 Wiley-VCH GmbH

demonstrated that the Pt nanoring electrode is sensitive to the local oxygen concentration changes (Figure 2b).

Next, we entrapped budding yeast cells (*S. cerevisiae*) with a typical diameter of 8 μm within microwells, as a biological standard to evaluate the cellular respiration within Opto-ElecWell device. After 15 min of basal respiration monitoring, we injected known modifiers of cellular oxygen consumption: FCCP (1×10^{-6} M), an uncoupler of oxidative phosphorylation that increases the cellular oxygen consumption, followed by the addition of metabolic poison Antimycin A (10×10^{-6} M), a specific inhibitor of mitochondrial electron transport chain. Figure 2c, shows the variations of cellular oxygen uptake with respect to the additions of FCCP, where there is an increase of the rate of oxygen consumption (1.5 μA min^{-1}) compared to the basal respiration of cells (0.6 μA min^{-1}) and the effect of drug Antimycin A, i.e., impairment of oxygen consumption. In order to demonstrate the effect of these drugs specifically toward the cells within the microwell array, the same experiment was repeated by adding the metabolic modulators in inverse fashion, i.e., addition of Antimycin A first, followed by FCCP and we observed no significant increase of oxygen uptake after the addition of FCCP.

Overall, the results obtained by monitoring oxygen consumption of cells, were fully consistent with the results widely reported using different technologies and well understood in conditions of modulations of the respiratory chain activity.[17,26,44,45] However, the higher interest of this presented OptoElecWell approach resides in the simultaneous use of high-resolution fluorescence imaging and electrochemical sensing which eventually leads to the dynamic monitoring of at least two-cell metabolic parameters (biophysical and biochemical properties). In this context, we monitored the effect of the concentrations of the carbon source (glucose) on cellular oxygen uptake rate linked with OXPHOS metabolism and the intracellular rheological properties within the cell, known to be impacted by metabolic changes.

3.3. Dual Detection: The Effect of Glucose Concentration on the Basal Oxygen Uptake Rate and Molecular Diffusion

Glucose is an essential carbon source for the production of ATP. The latter is mainly synthesized through glycolysis and OXPHOS through the mitochondrial respiration. It was recently shown that modulation of intracellular ATP concentration affected microrheological properties: lower ATP concentration decreased the diffusion of tracer particles.[8] It is critical for cells to sense and adapt to potential changes in glucose concentration. Yeast (*S. cerevisiae*) is as an excellent model organism to study glucose-derived metabolism through mitochondrial respiration.[46,47] Yeasts were cultured in media containing different glucose concentrations ranging from 0.5% to 2% of glucose. The media was osmotically compensated for the lower glucose concentrations (0.5% and 1%) in order to avoid additional osmotic perturbations in comparison with the control (2%). The effect of extracellular concentration of the glucose on both mitochondrial specific oxygen consumption rate (basal respiration) and internal dynamics of molecular diffusion was simultaneously measured on OptoElecWell device (**Figures 3** and **4**).

3.3.1. Basal Cellular Respiration Monitoring at Different Glucose Concentrations

Thanks to the high density of ring-shaped nanoelectrodes located within the microwells and the continuous CV-based sensing methodology, basal cellular oxygen uptake kinetics (Figure 3a), and end-point measurements (Figure 3b) were performed. The measured oxygen reduction current values, with respect to time, suggested that the oxygen uptake rate is at its maximum when the cells were exposed to 0.5% glucose (steep curve). Further increase in the extracellular glucose concentration resulted in a progressive decrement in the oxygen reduction peak currents, suggesting inferior oxygen uptake. However, the basal respiration monitoring at different glucose concentrations are trickier to interpret than the respiration measurements under metabolic modulators (Figure 2c,d). In the latter case, the respective oxygen consumption slopes of different activators and inhibitors were directly compared to the basal respiration within the same experiment. Hence, we proposed a theoretical model to comprehensively understand the OptoElecWell-based cellular oxygen consumption monitoring and the effect of substrate (glucose) concentration on their oxygen consumption kinetics (see the Experimental Section and Figure 3c). As shown in the Figure 3d (see also the Experimental Section), we estimated $I(t)$ $[(i_{measured} - i_{final})]$ values for different glucose concentrations and the evolution of inverse square currents $[1/I(t)]^2$ was plotted with respect to time. In all three cases, quasilinear variations were effectively obtained, demonstrating the "Cottrell-like behavior" in terms of cellular oxygen consumption. To further validate our methodology, the measured slopes of inverse square peak current values $[1/I(t)]^2$ at different glucose concentrations using OptoElecWell device were compared with the OCR values obtained by a commercial gold standard SeaHorse XF respirometer. We observed an excellent positive correlation between the two technologies, as demonstrated with the Pearson correlation and R-square values of 1.000 and 0.999, respectively (Figure 3e).

In addition, we also normalized the readings of both techniques, per cell, per minute, in an attempt to relate the obtained reductive current "I_{30min}" values (blank subtracted) to the cellular oxygen consumption rates (Figure 3f). Again we observed an excellent positive correlation and found out that a reductive current change of 100 pA was equivalent to $\approx 3 \times 10^{-15}$ M of basal cellular oxygen consumption. Even though the variability of measurements in the OptoElecWell device is on par with the Seahorse XF analyser (Pearson correlation and R-square values of 0.9968 and 0.9936, respectively), our device can function with at least 20 times lesser biological sample (10^3–10^4 cells) than the Seahorse XF respirometer (1.5×10^5 cells) and in addition, provides an optical means to monitor the contents within single cells in a high-throughput manner.

3.3.2. Optical Monitoring of Molecular Diffusion Through Single-Particle Tracking

The great optical capabilities of our OptoElecWell device allow for high-throughput confocal imaging inside cells (Figure 2d). We imaged GEMs nanoparticles in cells using a spinning disk

© 2021 Wiley-VCH GmbH

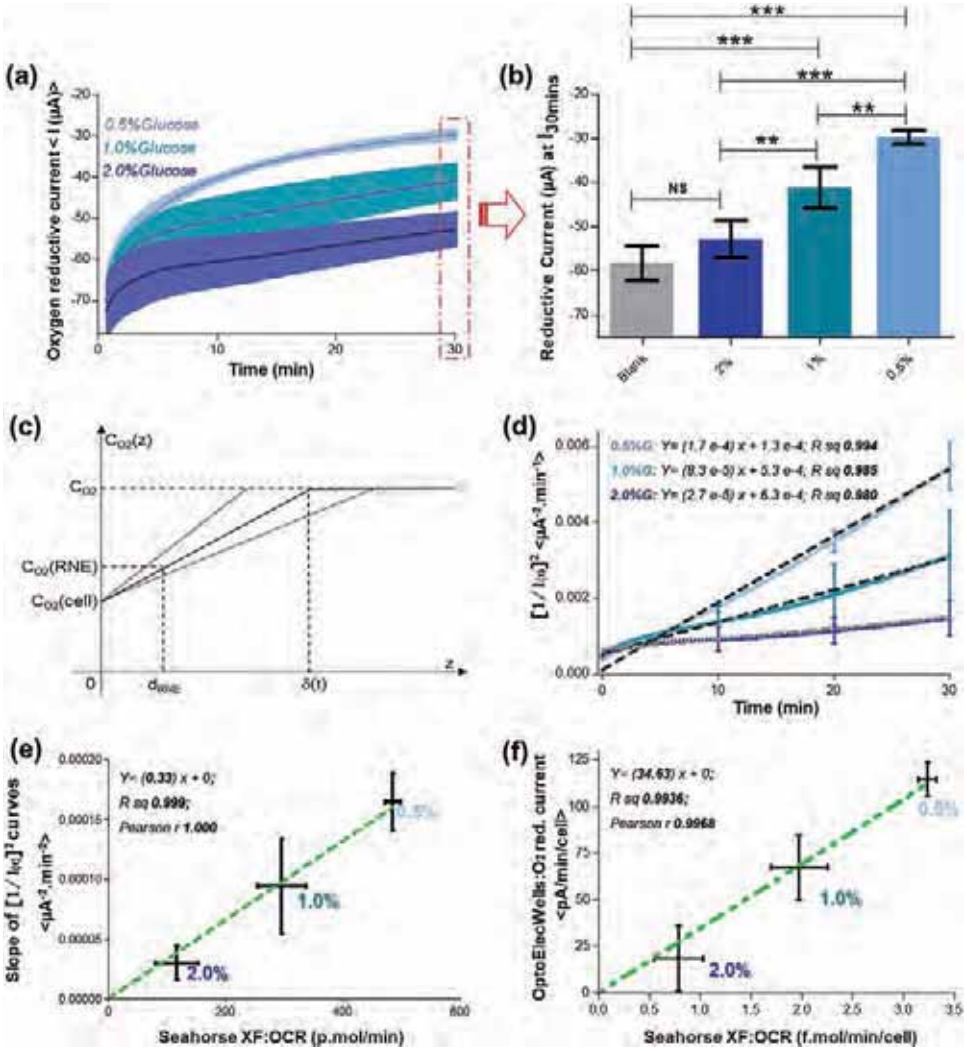


Figure 3. The effect of extracellular concentration of glucose on mitochondria specific cellular basal oxygen uptake rate: a) Kinetic evolution and b) end point values, at 30 min, of the oxygen reductive peak current biased at –0.7 V versus Ag/AgCl measured on each CV scan, under different substrate concentrations ranging from 0.5% to 2% of glucose. The standard deviations of each condition were represented as shaded error bands in the case of kinetic evolution ($n = 4$). The statistical difference between the end point values was assessed by ANOVA with *t*-test, where ***, **, and NS represents $p < 0.001$, $p < 0.01$, and no significant difference, respectively. c) Theoretical model for OptoElecWell based cellular oxygen consumption monitoring and the effect of substrate concentration on their oxygen consumption kinetics. C_{O2}, C_{O2}(RNE) and C_{O2}(cell) are the dissolved oxygen concentrations in the bulk solution, at the ring nanoelectrode surface and at the cell surface, d_{RNE} is the distance between ring nanoelectrode and the cell, and $\delta(t)$ is the time-dependent diffusion layer thickness. d) Time-evolution of inverse square peak current values at different glucose concentrations showing quasilinear variations, where $I(t)$ represents $i_{final} - i_{measured}$. d) The slopes of inverse square peak current values at different glucose concentrations were compared to the responses obtained from a commercial Seahorse XF. The number of cells used for cellular respiration measurement in OptoElecWell device and SeaHorse XF were $\approx 8.0 \times 10^3$ and 1.5×10^5, respectively. The Pearson correlation and R-square values were determined to be 1.000 and 0.999, respectively, where $n = 4$. e) Oxygen reductive current values (blank subtracted) of OptoElecWells and Seahorse XF OCR readings were normalized, per cell, per minute, to relate the obtained reductive current values to cellular oxygen consumption rates. The Pearson correlation and R-square values were determined to be 0.9968 and 0.9936, respectively where $n = 4$.

confocal microscope at 50 Hz imaging rate (see the Experimental Section). Single-particle tracking is possible in these conditions (Figure 4a; and Video S1, Supporting Information). Note that the imaging was performed while oxygen was electrochemically monitored in the device. We analyzed the trajectories as in[37] in order to extract ensemble-averaged mean-square displacement (MSD) curves and single particle short-term diffusion coefficients (Figure 4b,c). We observed that particles in lower glucose concentration diffused slower, with up to 20% increase between 0.5% and 2% glucose. Interestingly, diffusion seems to become anomalous under low oxygen concentration, with the power exponent of the MSD lower than 1. We plotted the measured diffusion coefficient, reflecting the viscosity of the cell interior, as a function of the oxygen consumption rate measured electrochemically. We observed an anti-correlation of the two quantities (Figure 4d): diffusion increases as oxygen consumption rate decreases (Pearson correlation and R-square values of 0.9988 and 0.9994, respectively). While an observed

© 2021 Wiley-VCH GmbH

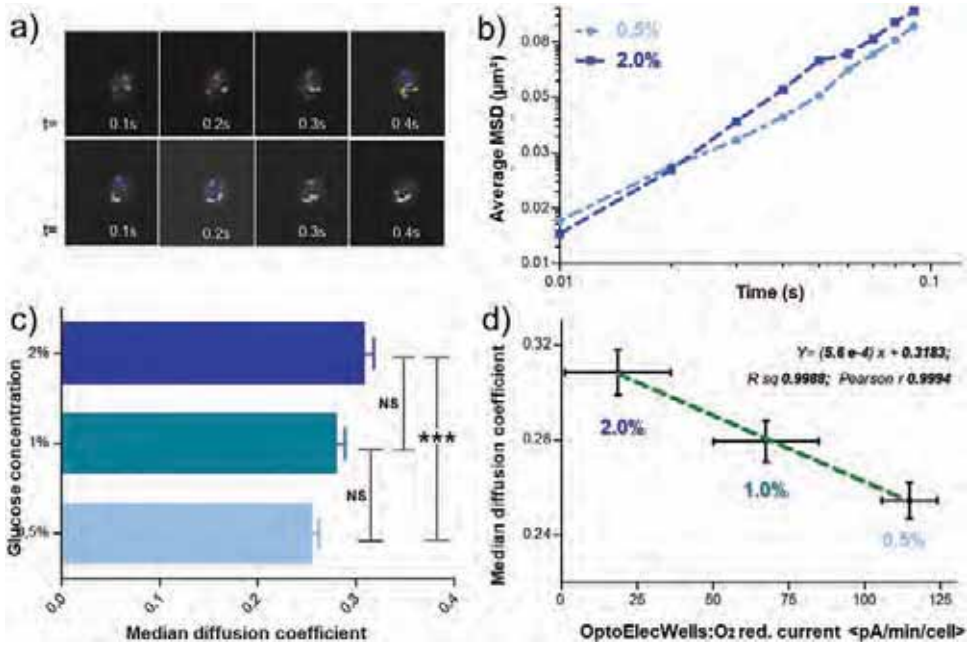


Figure 4. a) Time-lapse single particle tracking of entrapped yeast cells within the microwells. 40 nm GEMs were visualized using the T-sapphire fluorescent protein (green) and the diffusive trajectories of each particle were monitored using inverted confocal microscope (63× objective). b) The resultant average MSD versus time plot of entrapped yeast cells grown at 0.5% and 2% glucose concentration. c) The effect of extracellular concentration of glucose on the effective diffusion coefficients in yeast cells. Each bar represents the average MSD response of 700 individual GEM particles. The statistical difference between the groups was assessed by ANOVA with *t*-test, where *** and NS represents $p < 0.001$ and no significant difference. d) Evaluation of the relation between molecular diffusion and cellular basal oxygen respiration using OptoElecWells: The normalized oxygen reductive peak current values, per minute, per cell, at different glucose concentrations were compared to the responses obtained from GEMs mediated molecular diffusion coefficient measurements. The R-square and Pearson correlation values were determined to be 0.9988 and 0.9994, respectively.

decrease in oxygen respiration rates (aerobic metabolism) at higher glucose concentrations has been observed in the past, its link with changes in rheological parameters has never been established before.

4. Conclusion

We demonstrated in this article the feasibility of dual detection of electrochemical readout (oxygen here) and high-resolution fluorescence imaging (SPT of fluorescent nanoparticles). Our Oxygen detection technique is at the level of "state-of-the-art" in terms of accuracy and requires lower amounts of cellular material, compared to the commercial gold standard. As a proof of concept, we explored the understudied link between cellular metabolism and intracellular rheological properties. We find that while respiration increases, the diffusion of tracer particles decreases with lower oxygen diffusion. Respiration is linked with ATP production through mitochondria, and it is known that decreased biochemical activity associated with ATP depletion dramatically decreases tracers diffusion.[37] Our result thus appears as counterintuitive: while respiration increases, ATP production is expected to increase, with a potential increase in biochemical activity, which should fluidize the cytoplasm. We find the opposite: an increased respiration correlates with a decreased diffusion.

This result calls for a better understanding of the link between metabolism and intracellular rheology. Devices such as OptoElecWell are ideal to conduct these studies, coupling electrochemistry and high-resolution optics. In the present study and as a proof of concept, we only addressed the link between oxygen consumption rates with cellular rheology. We believe that this methodology serves as a starting point to further explore the complex relations between the cellular metabolic and rheological indicators. Because the platform described here has been designed to be flexible to allow higher levels of multiplexing, analytes such as glucose or lactate can be sensed along with other metabolic and rheological parameters with some minor surface modifications to the electrode surfaces.[37] Also note that the electrodes can function to clamp some physical parameters, such as oxygen: one electrode can be used to consume oxygen and impose a given concentration to infer the impact of different oxygen concentrations on metabolism and intracellular rheological properties.

Overall, our novel generation of OptoElecWell with dual detection approach takes simple cell-based analyses to multidimensional, multiparametric levels. It represents a powerful analytical tool, allowing rapid, simultaneous opto-electrochemical analyses of a large number of cells, while retaining the ability to address the single cells within the array. Dissecting the interdependence of crowding and metabolic activity will require different levels of perturbation, both chemical, acting on mitochondria, and through the use of different carbon sources.

This study provides a base that can enable the exploration of the missing links between the cellular metabolism (or cellular physiological responses) and its intracellular (rheological) properties.

© 2021 Wiley-VCH GmbH

Acknowledgements

This project was financially supported by the CNRS ("Centre National de la Recherche Scientifique") and the ANR ("Agence Nationale pour la Recherche", project MITOCARD (ANR-17-CE11-0041). The technological realisations and associated research works were partly supported by the French RENATECH network.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

V.S.V. and B.A. contributed equally to this work. V.S.V.: Methodology, Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – Original Draft, Visualization. B.A.: Methodology, Conceptualization, Validation, Investigation, Writing – Reveiw & Editing. A.L.: Investigation, Validation. C.C.: Investigation. E.S.: Investigation. P.T.-B.: Resources, Formal analysis, Writing – Original Draft & Editing, Funding acquisition. S.A.: Funding acquisition, Writing – Review & Editing. M.D.: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – Original Draft & Editing, Funding acquisition, Project administration. J.L.: Conceptualization, Methodology, Writing – Reveiw & Editing, Funding acquisition, Project administration.

Data Availability Statement

Research data are not shared.

Keywords

bioenergetics, cyclic voltammetry, GEMs single-particle tracking, microwells, nanoelectrodes, oxygen consumption, yeast cells

Received: February 12, 2021
Revised: March 29, 2021
Published online:

[1] S. T. Kinsey, B. R. Locke, R. M. Dillaman, *J. Exp. Biol.* **2011**, *214*, 263.
[2] D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt, F. C. MacKintosh, *Science* **2007**, *315*, 370.
[3] X. Trepat, L. Deng, S. S. An, D. Navajas, D. J. Tschumperlin, W. T. Gerthoffer, J. P. Butler, J. J. Fredberg, *Nature* **2007**, *447*, 592.
[4] S.-Y. Tee, A. R. Bausch, P. A. Janmey, *Curr. Biol.* **2009**, *19*, PR745.
[5] E. Makhija, D. S. Jokhun, G. v. Shivashankar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E32.
[6] Y. Abidine, A. Constantinescu, V. M. Laurent, V. Sundar Rajan, R. Michel, V. Laplaud, A. Duperray, C. Verdier, *Biophys. J.* **2018**, *114*, P1165.
[7] J. E. Kim, D. S. Reynolds, M. H. Zaman, M. Mak, *Integr. Biol.* **2018**, *10*, 232.
[8] S. Mathieu, J.-B. Manneville, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2019**, *56*, 34.
[9] T. Betz, M. Lenz, J.-F. Joanny, C. Sykes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15320.
[10] S. C. Weber, A. J. Spakowitz, J. A. Theriot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7338.
[11] M. Guo, A. J. Ehrlicher, M. H. Jensen, M. Renz, J. R. Moore, R. D. Goldman, J. Lippincott-Schwartz, F. C. Mackintosh, D. A. Weitz, *Cell* **2014**, *158*, P822.
[12] C. Alibert, B. Goud, J.-B. Manneville, *Biol. Cell* **2017**, *109*, 167.
[13] J. S. Kahn, *Anal. Biochem.* **1964**, *9*, 389.
[14] Oroboros Instruments, "Home – Oroboros Instruments," https://www.oroboros.at/ (accessed: September 2020).
[15] MitoXpress Xtra, https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/plate-reader-metabolic-assays/mitoxpress-xtra-oxygen-consumption-assay-740894 (accessed: September 2020).
[16] Seahorse XF, https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-analyzers (accessed: September 2020).
[17] H. Simonnet, A. Vigneron, J. Pouysségur, in *Methods in Enzymology*, Vol. 542 (Eds: L. Galluzzi, G. Kroemer), **2014**, Ch 8.
[18] J. Zhang, E. Nuebel, D. R. R. Wisidagama, K. Setoguchi, J. S. Hong, C. M. van Horn, S. S. Imam, L. Vergnes, C. S. Malone, C. M. Koehler, M. A. Teitell, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1068.
[19] M. Wu, A. Neilson, A. L. Swift, R. Moran, J. Tamagnine, D. Parslow, S. Armistead, K. Lemire, J. Orrell, J. Teich, S. Chomicz, D. A. Ferrick, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **2007**, *292*, C125.
[20] C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, J.-C. Drapier, H. Ghandour, A. C. W. Koh, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1472.
[21] K. Ino, H. Shiku, T. Matsue, *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *5*, 146.
[22] J. M. Díaz-Cruz, N. Serrano, C. Pérez-Ràfols, C. Ariño, M. Esteban, *J. Solid State Electrochem.* **2020**, *24*, 2653.
[23] J. T. Cox, B. Zhang, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *5*, 253.
[24] C. Amatore, S. Arbault, Y. Bouret, B. Cauli, M. Guille, A. Rancillac, J. Rossier, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 181.
[25] C. Amatore, S. Arbault, A. C. W. Koh, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1411.
[26] C. S. Santos, A. J. Kowaltowski, M. Bertotti, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11428.
[27] M. Nebel, S. Grützke, N. Diab, A. Schulte, W. Schuhmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 6335.
[28] Y. Date, S. Takano, H. Shiku, K. Ino, T. Ito-Sasaki, M. Yokoo, H. Abe, T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *30*, 100.
[29] V. S. Vajrala, F. Sekli Belaidi, G. Lemercier, D. Zigah, M. Rigoulet, A. Devin, N. Sojic, P. Temple-Boyer, J. Launay, S. Arbault, *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 672.
[30] F. Sékli Belaïdi, E. Vanhove, W. Tiddi, M. Polverel, G. Lemercier, A. Lecestre, P. Dubreuil, J. Launay, S. Arbault, P. Temple-Boyer, *Sens. Actuators, B* **2016**, *232*, 345.
[31] D. Wirtz, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 301.
[32] K. Mandal, A. Asnacios, B. Goud, J.-B. Manneville, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E7159.
[33] A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, T. Fujiwara, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 351.
[34] D. Alcor, G. Gouzer, A. Triller, *Eur. J. Neurosci.* **2009**, *30*, 987.
[35] K. A. Rose, M. Molaei, M. J. Boyle, D. Lee, J. C. Crocker, R. J. Composto, *J. Appl. Phys.* **2020**, *127*, 191101.
[36] M. Delarue, G. Poterewicz, O. Hoxha, J. Choi, W. Yoo, J. Kayser, L. Holt, O. Hallatschek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 13465.
[37] M. Delarue, G. P. Brittingham, S. Pfeffer, I. V. Surovtsev, S. Pinglay, K. J. Kennedy, M. Schaffer, J. I. Gutierrez, D. Sang, G. Poterewicz, J. K. Chung, J. M. Plitzko, J. T. Groves, C. Jacobs-Wagner, B. D. Engel, L. J. Holt, *Cell* **2018**, *174*, P338.
[38] V. S. Vajrala, F. Sekli Belaidi, G. Lemercier, D. Zigah, M. Rigoulet, A. Devin, N. Sojic, P. Temple-Boyer, J. Launay, S. Arbault, *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 672.

 © 2021 Wiley-VCH GmbH

[39] N. Barnabé, M. Butler, *Cytotechnology* **2000**, *34*, 47.
[40] K. Takeda, C. Starzynski, A. Mori, M. Yanagida,, *Mitochondrion* **2015**, *22*, 91.
[41] G. Lemercier, F. Sekli-Belaïdi, S. Vajrala, E. Descamps, J. Foncy, S. Arbault, J.-E. Sarry, P. Temple-Boyer, J. Launay, *Proceedings* **2017**, *1*, 289.
[42] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., Wiley, **2001**.
[43] G. Lemercier, F. S. Belaidi, V. S. R. Vajrala, S. Arbault, J. E. Sarry, J. Launay, P. Temple-Boyer, *2016 IEEE Nanotechnology Materials and Devices Conf. (NMDC)*, IEEE, Toulouse, France **2016**.
[44] B. G. Hill, G. A. Benavides, J. R. Lancaster, S. Ballinger, L. Dell'Italia, J. Zhang, V. M. Darley-Usmar, *Biol. Chem*. **2012**, *393*, 1485.
[45] J. S. Ruas, E. S. Siqueira-Santos, I. Amigo, E. Rodrigues-Silva, A. J. Kowaltowski, R. F. Castilho, *PLoS One* **2016**, *11*, e0150967.
[46] L. Galdieri, S. Mehrotra, S. Yu, A. Vancura, *OMICS: J. Integr. Biol.* **2010**, *14*, 629.
[47] M. Conrad, J. Schothorst, H. N. Kankipati, G. van Zeebroeck, M. Rubio-Texeira, J. M. Thevelein, *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38*, 254.

© 2021 Wiley-VCH GmbH