

Développement de système pour l'étude de l'impact des contraintes mécaniques sur le comportement de cellules cancéreuses

Audrey Prunet

▶ **To cite this version:**

Audrey Prunet. Développement de système pour l'étude de l'impact des contraintes mécaniques sur le comportement de cellules cancéreuses. Biophysique. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1082 . tel-03360274

HAL Id: tel-03360274
https://theses.hal.science/tel-03360274

Submitted on 30 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre NNT : 2020LYSE1082

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED 34 Matériaux

Spécialité de doctorat : Biophysique
Discipline : Physique

Soutenue publiquement le 06/05/2020, par :
Audrey PRUNET

Développement et validation de systèmes pour l'étude de l'impact des contraintes mécaniques sur le comportement de cellules cancéreuses

Devant le jury composé de :

Moyret Lalle, Caroline, Professeure des Universités, Université Lyon 1	Présidente
Nassoy Pierre, Directeur de recherche, Université de Bordeaux	Rapporteur
Piel, Matthieu, Directeur de recherche, Université Paris-Saclay	Rapporteur
Guilluy, Christophe, Chargé de recherche, Université Grenoble Alpes	Examinateur
Rivière, Charlotte, Maître de conférences, Université Lyon 1	Directrice de thèse
Delanoë-Ayari, Hélène, Maître de conférences, Université Lyon 1	Co-directrice de thèse
Maguer-Satta, Véronique, Directrice de recherche, Université Lyon 1	Invitée
Gabut, Mathieu, Chargé de Recherche, Université Lyon 1	Invité

Remerciements :

Remerciements :

Parce que le cancer est une atroce réalité :

À toi Valentin, je n'ai pas écrit une seule page sans penser à toi.
Continue à nous montrer la force et le courage incroyables que tes parents t'ont légués et continuent à t'apporter.
Tu es notre champion !

À toi François, pour la persévérance et la lucidité dont tu as toujours fait preuve.

Remerciements :

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble du jury pour l'attention qu'ils ont portée à ce travail : mes deux rapporteurs : Matthieu Piel et Pierre Nassoy, mes examinateurs Caroline Moyret-Lalle et Christophe Guilly ainsi que Véronique Maguer-Satta et Mathieu Gabut. Merci d'avoir accepté de participer à une soutenance en plein confinement et d'en avoir fait un bon moment de partage même dans ces conditions particulières.

Je remercie ensuite Charlotte et Hélène, pour tout le suivi scientifique de ma thèse mais également pour tout le soutien et la bienveillance dont vous avez fait preuve d'un point de vue plus personnel. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet comme celui-ci et d'avoir ensuite toujours trouvé les mots pour me rassurer quand je voyais le temps passer et les problèmes s'accumuler. Il y aura eu du suspens et des surprises jusqu'au bout !

Merci à toute l'équipe biophysique ; Sylvain, Jean Paul, Thomas et Olivier et aux doctorants et post doctorants Antony, Saba, Alexis, Gucci et Maleke : c'était super de vous voir tous arriver ! Bon courage pour la suite ! Merci également aux anciens membres, à Angélique : pour ta gentillesse à mon arrivée et à Marion : bonne chance pour ton nouveau projet ! Et à tous les stagiaires qui sont passés par là durant ces trois années.

Merci également à l'équipe liquide et interface. Merci pour tous les moments conviviaux, les repas de Noël et les barbecues partagés. Merci en particulier à Gilles, pour ta disponibilité et ton aide précieuse pour les différentes versions du système de confinement et à Catherine pour ton expertise en rhéologie. Merci à tous les anciens doctorants et aux actuels pour tous les bons moments de partage, bonne continuation à tous !

Merci aux deux équipes du CRCL avec qui j'ai eu la chance de collaborer « BMP, niche tumorale et résistance » et « Diversité du transcriptome des cellules souches ». Merci à Véronique Maguer-Satta pour tous les échanges toujours très enrichissants et à Sylvain pour tous tes retours sur le système et pour toutes les cellules, bonne chance pour tes concours ! Merci également à Kevin et Sandrine sur le début du projet et merci à tous pour votre accueil l'été 2018 lors de la fermeture du labo. Merci également à Mathieu Gabut pour toutes les discussions très riches et motivantes au début du projet et à Nabila et Caroline pour votre dynamisme et votre gentillesse.

Merci aussi à l'INL et à Magalie puis à l'équipe Fennec pour votre accueil dans vos salles de manip durant les travaux.

Merci à la Fondation pour la Recherche Médicale de m'avoir accordé un financement pour mes six derniers mois de thèse.

Merci à l'équipe de rugby féminin de l'ARCOL qui m'a permis de venir me défouler sur le terrain !

Merci à mes Lyonnais et maintenant tous ex-Lyonnais : mes trois années à Lyon auraient été complètement différentes si vous n'aviez pas été là ! Merci pour toutes les randonnées sous la pluie et autres activités sportives (oui oui « simplement » regarder un match de rugby c'est aussi du sport, surtout quand on soutient l'ASM en finale de top 14 !) et nos différents week-ends italiens. Une attention en plus au très bientôt docteur Mutschler : merci d'avoir partagé toutes les phases de doutes

et de craquages qui arrivent au cours d'une thèse (et on en a eu beaucoup !). Ça y est on est au bout ! À nous le Mexique ! (Ah et bien non finalement ce ne sera pas pour tout de suite…).

Merci à toute la bande de copains d'école, pour tous les week-ends et festivals toujours remplis de maturité et de sagesse ;), « plus ça va et moins ça va ! ». Merci aussi pour tous les échanges au quotidien sur nos multiples conversations interminables et pour votre soutien sur cette dernière année en particulier, ça a vraiment compté. Vous êtes tous géniaux, chacun à votre façon ; je suis fière et heureuse de vous avoir dans ma vie !

Enfin, merci à ma famille : à mes parents, grands-parents, mes oncles et tantes, à mes frères, ceux que j'ai toujours considérés comme des frères et sœurs et ceux qui s'y sont ajoutés naturellement. On dit souvent qu'on ne choisit pas sa famille et bien je n'aurais pas pu choisir mieux ! Merci pour tout votre soutien et pour tout votre amour. Merci de vous être toujours intéressés à l'avancée de ma thèse même si ces trois dernières années ont été chargées en événements pour notre famille et que la question était souvent « c'est quoi le problème encore ? ». Une pensée particulière à Valentin, Elena, Victoria et Mattéo : j'ai hâte de continuer à vous voir grandir ! Merci également à ceux qui auraient dû être encore là, vous me manquez ; j'ai eu beaucoup de chance de passer un bout de ma vie avec vous à mes côtés.

Et un grand merci à tous pour toutes les attentions que vous avez eu le jour de ma soutenance, vous n'avez pas pu être là physiquement mais grâce à vous c'était presque tout comme. Merci beaucoup !

Sing with me, sing for the years
Sing for the laughter, sing for the tears
Sing with me, if it's just for today
Dream on
Dream on, Aerosmith

Table des matières

Notation et abréviation : 11
Chapitre 1 : Introduction 12
1. Généralité cancérologie 12
2. Hétérogénéité et plasticité des cellules cancéreuses 14
2.1. Hétérogénéité inter et intra tumorale 14
2.2. L'impasse des tests traditionnels pour évaluer l'efficacité thérapeutique 15
2.3. Modèle de cellules souches cancéreuses 17
2.4. L'importance du microenvironnement tumoral : 22
3. Contraintes mécaniques et cellules cancéreuses 24
3.1. Propriétés mécaniques du microenvironnement tumoral 24
3.2. Méthodologie pour l'étude de l'impact des contraintes mécaniques 26
3.3. Importance des contraintes mécaniques sur les cellules cancéreuses 27
3.4. Contraintes mécaniques à l'échelle tissulaire pression homéostatique compétition cellulaire 28
Présentation du projet de thèse 30
Chapitre 2 : Les acteurs 31
1. Modèles biologiques utilisés dans le chapitre 3 31
1.1. La leucémie Myéloïde Chronique 31
1.2. Le cancer du sein 37
2. Modèles utilisés dans le chapitre 4 : 40
2.1. La lignée cellulaire HCT116 40
2.2. Le Glioblastome 41
3. L'hydrogel utilisé pour contrôler le microenvironnement des cellules dans cette thèse : l'agarose 46
3.1. Présentation générale 46
3.2. Caractérisation 47
Chapitre 3 : Système de confinement en 2D 49
1. Présentation du système de confinement 49
1.1. Systèmes existants 49
1.2. Contraintes et cahier des charges : 52
1.3. Difficultés et différentes versions : 53
2. Version finale du système de confinement 56
2.1. Le gel d'agarose : 57
2.2. Le système de serrage : 58
3. Validation du système de confinement : 60
3.1. Homogénéité et reproductibilité du confinement : 60
3.2. Viabilité cellulaire : 63
3.3. Vidéo-microscopie et suivi de prolifération : 64
3.4. Analyses moléculaires 65
3.5. Immunofluorescence : 66
3.6. Drug screening : 68
3.7. Ajustement de la rigidité : 69
4. Mécanique et signalisation 70
4.1. Mécano transduction chez les cellules hématopoïétique (TF1-GFP) : 1-Analyse globale de la population 70
4.2. Mécano transduction chez les cellules hématopoïétiques (TF1-BA) : 2- Analyse *in situ* par immunomarquage. 71
4.3. Co-culture de cellules leucémiques TF1-BA et cellules stromale HS27A : 72
4.4. Yes Associated Protein et MCF10A : 74
Discussion : 75
Chapitre 4 : Un modèle 3D, le sphéroïde 81

Table des matières

1. Présentation du système de micropuits 81
1.1. Systèmes de production de sphéroïdes existants 81
1.2. Description du dispositif 84
2. Applications 87
2.1. Suivi de prolifération 87
2.2. Suivi de cellules au sein de sphéroïdes à l'aide de marqueurs fluorescents 90
2.3. Immunomarquage 91
2.4. Cellules isolées 91
3. Croissances et contraintes 93
3.1. Croissance « libre » 93
3.2. Croissance sous contraintes de sphéroïdes HCT116 au sein des micropuits 95
3.3. Croissance sous contraintes isotropes : 1. Inclusion en agarose 100
3.4. Croissance sous contraintes isotropes : 2. Pression osmotique 103
Discussion : 105
Conclusion générale 109
Matériels et Méthodes Chapitre 3 : 111
Culture cellulaire 111
Fabrication du Wafer de silicium : 111
Moulage des gels d'agarose 111
Assemblage du système de confinement 112
Ensemencement et montage 112
Viabilité cellulaire 112
Immunomarquage 113
Microscopie 113
Analyse d'images et quantification 113
Western blot 114
Rt-qPCR 114
Analyses statistiques 114
Matériels et méthodes Partie 4 : 115
Culture cellulaire 115
Moules en silicium et contre-moule en PDMS 115
Traitement lamelles 116
Moulage des puits d'agarose 116
Montage des systèmes 117
Ensemencement cellules 117
Immunomarquage 117
Clarification 118
Suivi de prolifération 118
Suivi dynamique de cellules individuelles au sein de sphéroïdes 118
Suivi de cellules seules 119
Acquisition d'images d'immunomarquage 119
Inclusion agarose 119
Microscopie à force de Traction (TFM) 119
Annexes 121
Références 124

Tables des illustrations

Figure 1 : « Hallmarks of cancer » 12
Figure 2 : Représentation schématique des similitudes entre une tumeur (à droite) et le modèle de sphéroïdes (à gauche, MCTS : Multicellular tumor sphéroids). 15
Figure 3 : Émergence et popularisation du concept de cellules souches cancéreuses. 17
Figure 4 : Deux problèmes cliniques majeurs sont associés aux cellules souches cancéreuses (représentées en rouge). 18
Figure 5 : La plasticité des CSCs. 19
Figure 6 : Les cellules cancéreuses et leurs interactions avec le microenvironnement. 23
Figure 7 : Divers stimuli mécaniques sont rencontrés dans le tissu tumoral. 25
Figure 8 : Application de contraintes mécaniques sur des sphéroïdes. 26
Figure 9 : Pression homéostatique et compétition cellulaire. 29
Figure 10 : Hématopoïèse : de la cellule souche hématopoïétique aux composants matures du sang. 31
Figure 11 : Incidence des leucémies en fonction de l'âge la population des États-Unis, 2012-2016 NIH [119]. 32
Figure 12 : Formation de l'oncogène Bcr-Abl par translocation chromosomique. 33
Figure 13 Représentation simplifiée du mécanisme d'action de l'imatinib. 34
Figure 14 : Représentation du microenvironnement des cellules souches hématopoïétiques. 35
Figure 15 : Cellules souches leucémiques et construction de lignées. 36
Figure 16 : Incidence et nombre de décès du cancer du sein, au niveau mondial, pour les deux sexes, à tous les âges (Globocan 2018). 37
Figure 17 : Le sein et son microenvironnement. 38
Figure 18 : Hypothèses sur l'origine des cellules de glioblastome. 43
Figure 19 : Mécanisme de suivi de l'activité du protéasome par fusion d'une protéine fluorescente avec un dégron. 45
Figure 20 : Essai de Traction de cylindre d'agarose Ultra Low 2 % m/v contenant des billes Ø400 nm. 47
Figure 21 : Mesures rhéologiques du module élastique G' et du module de cisaillement G'' d'un échantillon d'agarose Low melt 1 % m/v. 48
Figure 22 : Principe du système de confinement cellulaire. 52
Figure 23 : Premières versions du système de confinement. 53
Figure 24 : Version finale du système de compression. 55
Figure 25 : Préparation et assemblage du système de confinement cellulaire. 56
Figure 26 : Photos des différents éléments constituant le système de confinement et leur dénomination. 57
Figure 27 : Support pièce A et gel d'agarose. 58
Figure 28 : Dessin technique de la partie inférieure du système de confinement Pièce B. 58
Figure 29 : Quantification de la hauteur des piliers d'agarose. 61
Figure 30 : Quantification de la morphologie cellulaire avec et sans confinement. 62
Figure 31 : Test de viabilité cellulaire des cellules MCF10A. 63
Figure 32 : Ratio de prolifération pour le contrôle sans agarose, piliers de 30 µm et de 5 µm. 64
Figure 33 : Snapshot de timelapses 65
Figure 34 : Western blot montrant le niveau de la protéine Cyclin B1 des cellules HS27A 65
Figure 35 : Quantification des cellules MCF10A prolifératives après 24 h dans le système. (A) (B) (C) avec des piliers de 30 µm (D) (E) (F) pour un confinement à 5 µm. 66
Figure 36 : Immunomarquage in situ de cellules non adhérentes TF1-BA, marquage après 1 jour dans le système des noyaux en vert (Nucgreen) et de l'actine en rouge (phalloidine). 67

Figure 37 : Morphologie nucléaire des cellules TF1-BA après 72 h de confinement sous confinement avec Agarose Ultra low gelling point 2 % (m/v), Agarose standard et sans confinement. 69
Figure 38 : Résultats RT-qPCR de cellules TF1-GFP après 48 h dans le système, en séparant les cellules adhérentes des cellules non adhérentes. 70
Figure 39 : Visualisation des bords des puits à 30 µm à 72 h pour les TF1-GFP. 71
Figure 40 : Immunomarquage du facteur de transcription twist1 et des noyaux (nucgreen) sur des cellules TF1-BA après 72 h avec ou sans confinement 40x. 72
Figure 41 : Immunomarquage Co-culture de cellules stromales HS27A et cellules leucémiques TF1-BA avec et sans confinement après 72 h. Actine : Jaune, Noyaux : cyan, Yap : rouge. 73
Figure 42 : Immunomarquage du facteur de transcription YAP (rouge) associé à un marquage nucléaire (cyan) sur les cellules mammaires MCF10A après 2 h (A,B,E,F) ou après 24 h (C,D,G,H). 74
Figure 43 : Récapitulatif des différentes méthodes de génération de sphéroïdes Issu de[297]. 82
Figure 44 : Représentation de la fabrication des puits en agarose. 85
Figure 45 : Formation d'un sphéroïde par agrégation de cellules HCT116 au fond d'un puits d'agarose, (Ø200 µm) en agarose (standard 4% m/v). Echelle = 50 µm. 85
Figure 46 : Représentation de la configuration des micropuits. 86
Figure 47: Différents phénotypes observés pour les cellules N14 Zsgreen. 88
Figure 48 : Suivi de prolifération de sphéroïdes N14. 89
Figure 49 : Projection en 2D du suivi dynamique en 3D d'une cellule Zsgreen positive au sein d'un sphéroïde de N14. 90
Figure 50 : Immunomarquages d'un sphéroïde HCT116. 91
Figure 51 : Test de cellules isolées N14 dans des micropuits d'agarose standard Ø100 µm. 92
Figure 52 : Temps de division obtenu cellules N14. Les valeurs sont obtenues par l'analyse d'expériences de "spheres forming assay", méthode présentée en 2.4. 93
Figure 53 : Ajustement linéaire et exponentiel pour les deux lignées respectivement suivant le modèle surfacique (2 graphes de gauche en R-R0) et volumique (2 graphes de droite en R/R0). 94
Figure 54 : Coupe transversale au milieu d'un sphéroïde de N14 95
Figure 55 : Exemple d'un sphéroïde HCT116 contraint dans un micropuits d'agarose standard 2%. 95
Figure 56 : Suivi de la croissance et prolifération d'un sphéroïde HCT 116 contraint dans des micropuits d'agarose Ultra Low Gelling Point 2% (m/v). 96
Figure 57 : Analyses des déplacements. 98
Figure 58 : Calcul des déformations et contraintes mécaniques. 99
Figure 59 Analyses des déplacements. 100
Figure 60 : Visualisation du déplacement moyen à t=26 h. 101
Figure 61 : Prolifération des sphéroïdes HCT116 dans une matrice d'agarose Low-Melting point. 101
Figure 63 : Immunomarquage des sphéroïdes de HCT116 inclus agarose Low melting point. 102
Figure 63 : Immunomarquage des sphéroïdes N14. 104
Figure SI 1 : Contrôle des marquages Live and Dead sur des MCF10A. 117
Figure SI 2 : TF1 BA à J3 avec et sans traitement à l'Imatinib 2 µM durant 3 jours. 118
Figure Si 3 : Résultats obtenus par simulation à l'aide du logiciel Comsol. 119
Vidéo 1 : Montage du système de confinement cellulaire.
Vidéo 2 : Timelapse TF1-BA contrôle 30 µm et confinement 5 µm Echelle : 50 µm.
Vidéo 3 : Timelapse MCF10A contrôle 30 µm et confinement 5 µm Echelle : 50 µm.
Vidéo 4 : Visualisation de la croissance d'un sphéroïde HCT116, puits d'agarose Ulow Gelling point avec billes fluorescentes.
Vidéo 5 : Visualisation des déplacements autour d'un sphéroïde HCT116. Intervalle entre deux frames :2 h.

Notation et abréviation :

Ø : diamètre
ε: déformation
σ: contrainte
ν : coefficient de Poisson
E : module de Young
G : module de rigidité
R : rayon
U : déplacement

2D : Deux dimensions
3D : Trois dimensions
ABL : Abelson
AFM : Microscopie à force atomique *(Atomic force microscopy)*
APTS: Amino-propyl-tri(ethoxy)silane
BRCA: *BReast Cancer*
BSA : Albumine de sérum *(Bovin Serum Albumin)*
CSC : Cellules Souche Cancéreuse
CRCL : Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
CSG : Cellule Souche de Glioblastome
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
Edu: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
FACs : Cytométrie en flux *(Fluorescence Activated Cell Sorting)*
GBM: Glioblastome
GFP: Protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein)*
GM-CSF : facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages *(Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)*
GPU : Processeur graphique *(Graphics Processing Unit)*
Inox : Acier inoxydable
ILM : Institut Lumière Matière
IP : Iodure de Propidium
KIT : méthode de Kanade-Lucas-Tomasi
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
PC : Polycarbonate
PDMS : PolyDiMéthylSiloxane
PFA : Paraformaldéhyde
PGMEA : acétate d'éther méthylique de propylène glycol *(Propylene glycol methyl ether acetate)*
qRT-PCR : quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TFM : microscopie à force de traction *(Traction Force Microscopy)*
TKI: *(Tyrosine Kinase Inhibitor)*
T-X: Triton
UV : rayonnement Ultra-Violet
YAP : Yes-Associated-Protein

Chapitre 1 : Introduction

1. Généralité cancérologie

Caractéristiques générales :

Le cancer est une pathologie extrêmement complexe, qui malgré d'intenses recherches constitue toujours une des causes majeures de décès dans le monde[1]. Les modèles et les hypothèses concernant le développement tumoral se sont succédé au cours du temps et continuent à se complexifier. Dès 1845, la notion de prolifération cellulaire incontrôlée est apparue, mais une définition précise demeure difficile à donner[2]. Le cancer dérive d'un tissu sain où le contrôle de la prolifération ou de la mort cellulaire est perdu. Ceci serait le résultat de mutations génétiques touchant les gènes d'apoptose ou de division cellulaire. Cependant, ce modèle semble bien trop simpliste. Les cancers n'étant pas uniquement liés à des mutations génétiques, mais aussi à d'autres facteurs tels que l'environnement tissulaire, l'épigénétique, les contraintes mécaniques ou encore les cellules souches cancéreuses.

Dans les années 2000, Hanahan et Weinberg ont résumé les propriétés acquises par les cellules qui deviennent cancéreuses en 6 caractéristiques majeures : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, la capacité d'échappement à l'apoptose, la réplication illimitée, l'induction de l'angiogenèse et la capacité d'invasion et de formation de métastases[3]. Une dizaine d'années après, les mêmes auteurs y ajoutent deux capacités : la modification du métabolisme énergétique cellulaire et la capacité d'évitement du système immunitaire et deux éléments favorisant les cancers : l'inflammation et l'instabilité génomique[4].

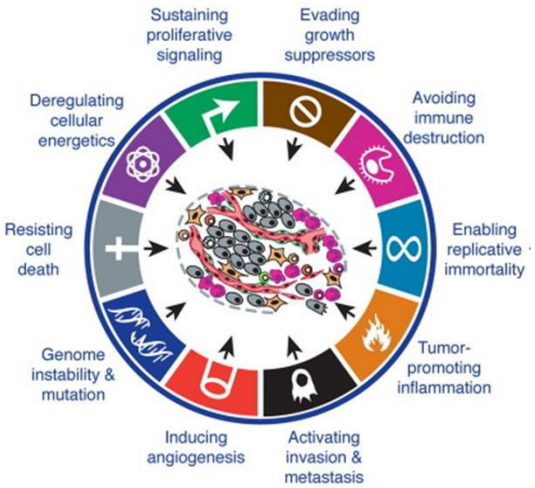


Figure 1 : « Hallmarks of cancer » : Les dix caractéristiques majeures associées au développement de cancers[4].

Toutefois, ces synthèses sont souvent critiquées, car considérées comme toujours trop simplistes[5]. Il est cependant compliqué de trouver le juste milieu entre des systèmes trop simplifiés et des modèles beaucoup trop complexes pour être synthétisés rapidement[6].

Le cancer est souvent mentionné dans sa forme au singulier, mais cette utilisation semble inadaptée. Ce terme regroupe en réalité plus d'une centaine de pathologies très différentes en termes d'origine, de progression, de symptômes mais aussi d'incidences et de mortalité. Il semble donc assez utopiste de trouver un modèle pouvant s'appliquer à tous les types de cancers rencontrés. Trois grandes catégories se détachent : les tumeurs solides avec les sarcomes (touchant les os ou le cartilage), les carcinomes (poumons, seins …) et les cancers « liquides » avec les leucémies (moelle osseuse et sang) et les lymphomes (glanglions lymphatiques, rate). Des sous-catégories de cancer sont données par la suite suivant la localisation de la tumeur primaire.

L'incidence varie considérablement suivant le type, certains cancers sont relativement rares alors que d'autres sont beaucoup plus fréquents. Le taux standardisé pour l'âge est l'effectif rapporté à la structure d'âge d'une population de référence et permet de s'affranchir des différences de la pyramide des âges. Pour un homme et basé sur les statistiques mondiales 2018, ce taux est de 3.80 concernant le cancer du poumon alors qu'il est 10 fois inférieur pour les cancers du cerveau et encore 8 fois inférieurs concernant les glandes salivaires par exemple[7]. Les causes sont très variées, multifactorielles et encore largement incomprises. Des mutations héréditaires ont été établies. C'est vrai par exemple pour le cancer du sein pour lequel elles induiraient 5 à 10% des cas. Des facteurs environnementaux, comme le tabac, ont été largement mis en cause pour le cancer du poumon ou les rayons UV pour les mélanomes. Une cause virale a également été introduite pour le cancer du col de l'utérus avec le papillomavirus et pour le cancer du foie avec l'hépatite B[8]. Des études ont expliqué l'incidence de certains types de cancers en fonction du nombre de divisions des cellules souches constituant le tissu : le nombre de cas importants de cancer du côlon[7] pourrait par exemple s'expliquer en partie par son renouvellement continu et le taux de division important des cellules souches épithéliales qui le constituent[9].

Malgré d'importants efforts de recherche au niveau mondial et des « plans cancer » conséquents se succédant notamment en France et aux États-Unis[10], le taux de mortalité reste très haut pour certains types de tumeurs. Des progrès considérables ont été faits (particulièrement en termes de dépistage) et l'arsenal des agents et techniques thérapeutiques augmente ; néanmoins la rémission complète des patients est encore difficile à obtenir et certains types de cancers demeurent incurables (exemple du glioblastome développé dans le chapitre 2). Ceci amène à repenser les différentes approches thérapeutiques et à changer de perspectives, les tumeurs cancéreuses ne sont plus considérées comme seulement une maladie de cellules particulières mais de manière beaucoup plus globale comme une maladie à l'échelle de l'organisme où l'organisation physiologique est modifiée.

La limitation de l'efficacité des thérapies actuelles peut être attribuée à différentes problématiques : notamment l'incroyable hétérogénéité inter et intra-tumorale, la résistance et la plasticité de certaines cellules cancéreuses, l'importance des signaux du microenvironnement et le manque de pertinence des modèles d'études utilisés. Nous tenterons d'en expliquer quelques aspects dans la section suivante.

2. Hétérogénéité et plasticité des cellules cancéreuses

2.1. Hétérogénéité inter et intra tumorale

L'une des premières difficultés à l'élaboration des traitements efficaces pour le plus grand nombre est la très vaste hétérogénéité rencontrée. Cette variabilité s'exprime entre les patients présentant une tumeur d'un même groupe histologique mais aussi de manière intra-tumorale[11,12]. Au sein d'un même patient, la population de cellules cancéreuses présente des différences génétiques, épigénétiques, phénotypiques et transcriptomiques. Ces dernières ont été mises en avant assez récemment par des innovations technologiques en matière d'analyses moléculaires, par des projets de grande ampleur comme « the Cancer Genome Atlas »[13,14] et par des analyses à l'échelle de la cellule unique[15, 16].

Cette diversité est instable, les altérations sont dynamiques et continuent d'évoluer même après l'initiation du processus tumoral. En 2014, R. Weinberg constatait : « Each tumor seemed a unique experiment of nature—acquiring a unique set of mutant genes in an unpredictable chronological order »[6]. Elle est due tout d'abord à une instabilité génétique et chromosomique rencontrée dans le contexte tumoral[17] mais aussi à des phénomènes de chromothripsis (remaniement de plus de 10 segments d'un chromosome en un seul événement) résultant en des changements génétiques drastiques retrouvés dans divers types de cancer et notamment le glioblastome[18]. Des diversités sont également rencontrées au niveau des facteurs épigénétiques (méthylation de l'ADN et remodelage de la chromatine, par exemple) et contribuent également à cette hétérogénéité évolutive[19]. Cette évolution temporelle peut également être renforcée par la mise en place de thérapies. Différents phénomènes peuvent alors participer aux changements qui apparaissent au cours du temps. Tout d'abord, ces thérapies induisent une sélection des sous-populations de cellules ne répondant pas aux outils thérapeutiques engagés[20], mais elles peuvent également induire des altérations et mutations supplémentaires au sein des tissus visés. Des études de biopsies à différents temps ont par exemple montré que des chimiothérapies induisent une modification des mutations rencontrées au sein de tumeurs[21, 22]. De plus, des phénomènes de résistance peuvent se mettre en place. Après thérapie moléculaire ciblée et l'utilisation d'inhibiteur de tyrosine kinase, des mécanismes d'adaptation peuvent être observés par mutations secondaires et modifications de leur cible ou par l'activation de voies parallèles, de contournement qui suppriment alors le bénéfice des inhibiteurs[23]. Ils peuvent se mettre en place très rapidement et ne pas entraîner de bénéfice clinique ou alors prendre plus de temps. Dans ce cas, une première phase d'efficacité est observée avant de laisser la place à une deuxième phase de rechute.

Ces différents éléments amènent donc à ne pas voir une tumeur comme une entité homogène et statique. Une mise en place des traitements de plus en plus individualisée, pouvant s'adapter aux caractéristiques propres de la pathologie semble primordiale pour continuer à faire reculer le taux de mortalité des cancers. La médecine de précision est actuellement en plein développement, elle est encore au niveau de la recherche et preuve de concept mais pourrait être appliquée en clinique d'ici peu[24].

2.2. L'impasse des tests traditionnels pour évaluer l'efficacité thérapeutique

Une autre difficulté concerne les modèles biologiques utilisés pour la recherche et les tests de thérapies. La recherche de nouvelles options thérapeutiques continue, mais produit relativement peu de nouvelles solutions effectives. Il existe une grande divergence entre le nombre de candidats-médicaments et le nombre de molécules approuvées[25,26]. La procédure standard de développement de nouvelles molécules thérapeutiques nécessite trois phases : des tests *in vitro* en 2D puis sur des modèles murins et enfin sur des humains par essais cliniques. Il existe ainsi un énorme écart entre chaque phase du processus. Produire des systèmes de plus en plus pertinents pourrait permettre d'identifier plus efficacement le potentiel de nouveaux agents thérapeutiques mais pourrait également aider les cliniciens à ajuster les traitements et à avancer dans la médecine personnalisée. En recherche fondamentale, cela pourrait aussi permettre d'améliorer la compréhension de la complexité des mécanismes cellulaires entrant en jeu, en obtenant ainsi des conditions plus physiologiques.

Les modèles *in vitro*

Les systèmes de culture 2D classiques sont très largement utilisés pour les analyses d'efficacité de thérapies ou de modélisation de pathologie. Cependant, même si elles ont permis d'énormes avancées, elles présentent d'importantes limites et ne représentent que peu l'architecture et l'environnement cellulaire retrouvé *in vivo.* Des modèles de culture en 3D ont émergé et sont devenus des alternatives intéressantes entre la culture cellulaire 2D et des modèles animaux[27]. Parmi eux, un modèle de sphéroïde multicellulaire apparait comme un modèle de choix pour l'étude de tumeurs solides non vascularisées ; il reste relativement simple et permet de reproduire l'organisation en 3D de micro-tumeurs. Ils sont générés par auto-agrégation cellulaire qui ont ensuite tendance à former et progresser en forme sphérique. Ils permettent de reproduire les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire mais présentent également des caractéristiques physiopathologiques rencontrées *in vivo* comme l'établissement d'un gradient de nutriments, d'oxygène et de pH Figure 2. Ils peuvent éventuellement modéliser la difficulté de pénétration de molécules thérapeutiques.

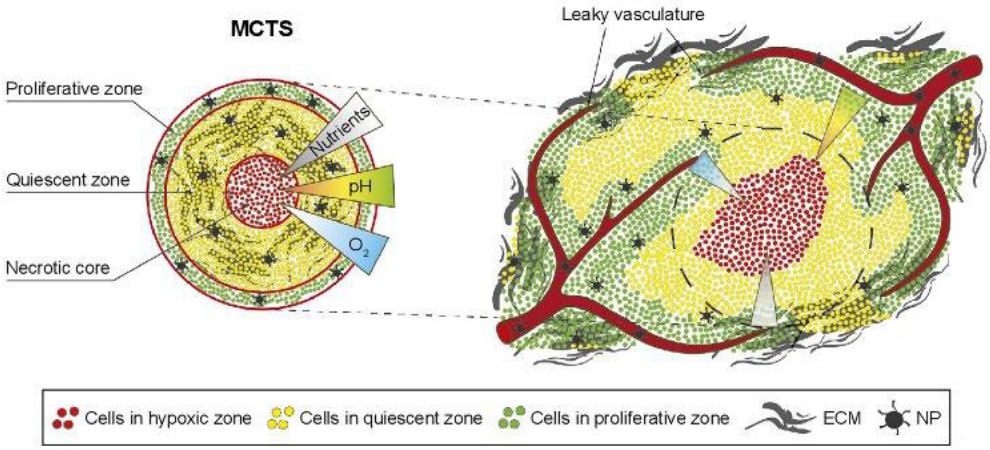


Figure 2 : Représentation schématique des similitudes entre une tumeur (à droite) et le modèle de sphéroïdes (à gauche, MCTS : Multicellular tumor sphéroids). Trois gradients de concentrations sont comparables entre les deux situations : un gradient d'oxygène, de nutriments et de pH[357].

La pertinence de ces agrégats pour modéliser une micro-région tumorale ou micrométastase est désormais admise et leur intérêt est croissant. Ils sont maintenant assez couramment utilisés pour l'évaluation de nouvelles drogues[28], de phénomènes d'angiogénèse[29] ou d'invasion[30]. Ils peuvent être formés à partir de cellules de patients et constituer un outil de médecine personnalisée. Ce mode de culture peut être également employé afin d'enrichir la population en cellules souches[31]. Cependant, leur production et leur analyse (notamment visualisation) sont évidemment plus complexes que les monocouches cellulaires ; des efforts doivent encore être faits afin d'obtenir des techniques de production et d'analyse plus rapides, plus reproductibles et à plus haut débit afin de les utiliser de plus en plus en facilement. Des structures plus complexes émergent et associent différents types cellulaires à ces structures 3D comme des cellules stromales ou immunitaires[32, 33].

Plus récemment, un autre type de culture en 3D a émergé : les organoïdes. Leur principe de base consiste en des structures multicellulaires tridimensionnelles conçues à partir de cellules souches (embryonnaires, adultes ou induites) mises en culture dans une matrice. Grâce à leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation, ils s'autoorganisent et recréent la micro-anatomie d'un organe particulier. Ils sont également utilisés afin de mimer les conditions tumorales [34]. Différents modèles ont été créés à partir de cellules de patients pour reproduire des tumeurs colorectales, gastriques, mammaires ou pancréatiques notamment[35]. Des cohortes ont montré une corrélation forte entre la réponse thérapeutique des patients en comparaison avec les organoïdes engendrés pour différents types de cancers[36]. Ils sont utilisés pour créer des biobanques et permettent par exemple de retranscrire les hétérogénéités tumorales rencontrées entres les individus[37].

La terminologie et la distinction entre ces deux cultures 3D ne sont pas toujours très claires (particulièrement lorsqu'ils dérivent de biopsies) et aucune définition précise ne leur ait donné[38]. Le terme de sphère semble pouvoir s'appliquer aux sphéroïdes mais aussi au début du développement d'organoïdes ; il peut se dériver en différentes catégories suivants les cellules qu'il engage : tumorosphères (cellules cancéreuses), mammosphères (cellules mammaires), neurosphères (cellules neurales), colosphère (cellules colorectales) ...

Ces entités ne permettent cependant toujours pas de modéliser l'interaction entre les tissus, la vascularisation ou l'ensemble des propriétés mécaniques. Des systèmes microfluidiques sont alors pensés pour répondre à ces problématiques ; ils peuvent permettre de créer des interfaces tissulaires, une vascularisation des cultures en 3D ou de les relier[39]. Même si ces outils semblent prometteurs des innovations technologiques sont nécessaires pour accroître leur accessibilité et permettre ainsi leur utilisation en routine.

Les modèles animaux

Concernant l'utilisation du modèle animal, des problématiques éthiques et économiques mais également de pertinence se posent[40]. Au cours de cette dernière décennie, des modèles de greffes xénogéniques (PDX = Patient-derived tumor xenografts) ont nourri beaucoup d'espoir et ont permis des avancées mais présentent maintenant leurs limites[41]. Les transplants dérivent rapidement et les animaux sont tout d'abord privés de système immunitaire il est donc impossible de les utiliser pour l'immunothérapie[42]. Des recherches se tournent maintenant sur l'utilisation de modèles murins humanisés avec un système immunitaire humain[43]. Outre le criblage thérapeutique, ces modèles de xénogreffes présentent des systèmes de choix notamment pour l'étude de la progression ou

dissémination tumorale en combinaison avec des méthodes de traçages cellulaires, exemple dans des modèles transparisés ou des modèles embryologiques particuliers pour l'étude de cancer pédiatrique[44,45].

2.3. Modèle de cellules souches cancéreuses

Concept des cellules souches cancéreuses (CSCs) :

Un nouveau modèle a remis en cause la définition généraliste du cancer comme étant exclusivement relié à une prolifération excessive. L'existence de cellules couches cancéreuses a émergé à partir du milieu des années 1990 chez des patients de leucémie myéloïde aiguë. Une équipe montre l'existence d'une sous-population particulière et assez rare de cellules cancéreuses isolées de la moelle osseuse de patients, est capable de reproduire les différents aspects de la pathologie lorsqu'elles sont implantées chez des souris immunodéficientes[46]. Ils montrent que ces cellules particulières présentent des caractéristiques qui sont données aux « cellules souches » telles que la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. C'est à partir de ces travaux qu'un nouveau modèle est né : le développement tumoral serait hiérarchisé et maintenu par une portion de cellules cancéreuses dites souches. C'est à partir du début des années 2000 que l'analogie est retrouvée également au sein de tumeurs solides avec le cancer du sein[47] puis dans la plupart des cancers communs comme le cancer du cerveau, colorectal, du poumon, de la prostate[48] Figure 3.

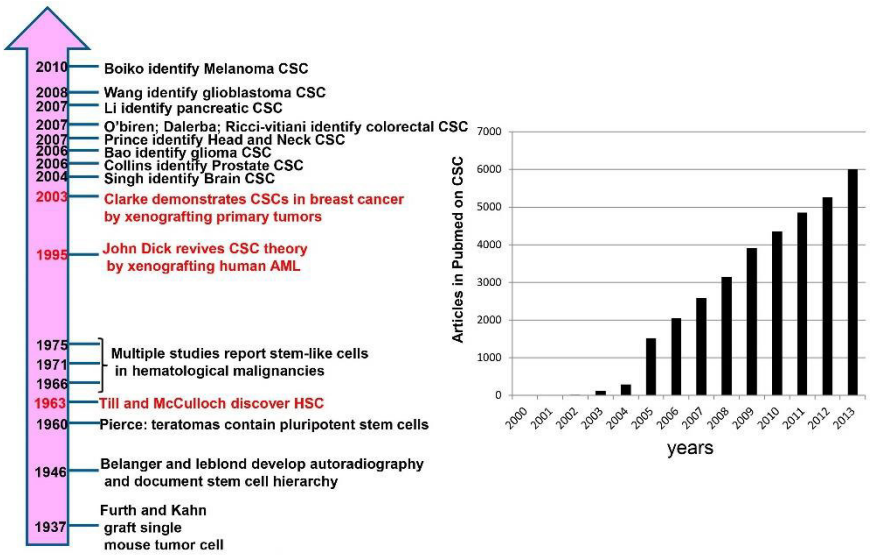


Figure 3 : Emergence et popularisation du concept de cellules souches cancéreuses. Après l'apparition de cellules souches hématopoïétiques (HSC), le concept de CSCs apparait dans le contexte de leucémies Myéloïdes Aigues (AML) puis dans les tumeurs solides à partir de 2003. Elles sont désormais au cœur de la recherche en cancérologie.

Au sein des tumeurs, seules certaines cellules seraient capables d'initier la tumorigénèse et de générer l'ensemble des types cellulaires présents au sein de la tumeur ; il y aurait alors une forme de hiérarchisation des cellules des tumeurs avec la présence de cellules plus ou moins différenciées. Ce modèle est attractif car il permet d'expliquer les observations cliniques et les rechutes qui apparaissent malgré l'utilisation de procédés thérapeutiques très agressifs comme les différentes chimiothérapies et/ou radiothérapies. En effet, ces CSCs survivraient à ce type de procédés ciblant la division et seraient

responsables de la recrudescence tumorale[49]. L'échappement thérapeutique s'expliquerait d'abord par différentes propriétés intrinsèques des cellules. Les CSCs peuvent présenter un long cycle mitotique et/ou une capacité à se mettre en quiescence, les molécules de chimiothérapies qui ciblent principalement les cellules avec un fort taux de division et ont donc une activité limitée sur ces dernières. Elles présentent ensuite une capacité accrue de réponse à des dommages à l'ADN, une résistance supérieure à certaines morts cellulaires par une expression augmentée des inhibiteurs à l'apoptose mais également de transporteurs membranaires capables d'exclure les éléments étrangers : les pompes à efflux, ce qui participe à l'inactivation des molécules thérapeutiques sur ce type de cellules[49].

Les cellules cancéreuses seraient également essentielles dans la dissémination cancéreuse et la production de métastases[50]. Pour les cancers solides, c'est cette capacité à s'étendre à d'autres tissus qui est responsable de près de 90 % des cancers[51]. Elles constitueraient ainsi la cible à atteindre pour obtenir une réelle rémission et une vraie évolution dans le taux de mortalité des cancers. Elles sont donc, depuis l'apparition du concept de CSCs, au cœur des questionnements de la recherche contre le cancer Figure 4.

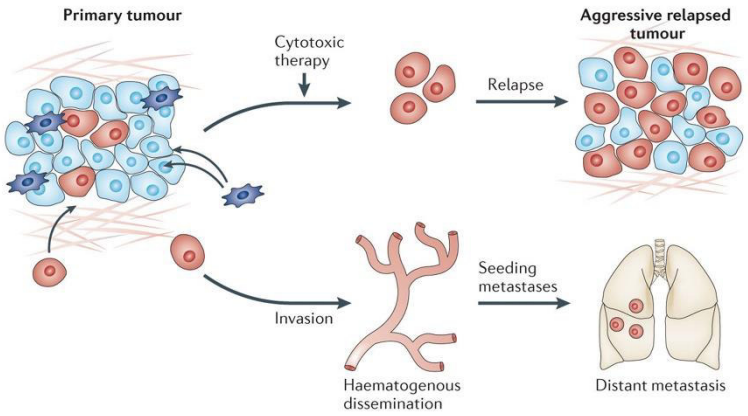


Figure 4 : Deux problèmes cliniques majeurs sont associés aux cellules souches cancéreuses (représentées en rouge) : elles résistent aux thérapies cytotoxiques et ont la propension de former des métastases. Issu de[358]

La présence de cellules souches cancéreuses est assez globalement acceptée en ce qui concerne les cancers dit « liquides », mais il est encore assez débattu concernant les tumeurs solides. Cependant, les discordes semblent plus se tourner sur la terminologie utilisée ou de définitions et caractérisations qui ne font pas encore consensus que sur la réelle présence d'une population de cellules cancéreuses avec de telles propriétés. Les intenses recherches autour de ces problématiques amènent à une complexification de plus en plus importante du modèle. Différentes désignations sont utilisées pour cette fraction de cellules cancéreuses : cellules souches cancéreuses, cancer stem like cells, tumor propagating cells, tumor repopulating cells et représentent bien la difficulté de consensus.

Il est important de noter que la cellule souche cancéreuse est bien à dissocier de la notion de cellule à l'origine. Cette dernière fait référence à la cellule qui a reçu la première modification amenant à l'oncogenèse. Pour certains types de cancer, il est suspecté que ce soit une cellule souche saine du tissu qui subisse les premières modifications pour quelques types de cancer. Cependant, ceci est loin d'être le cas pour tous les types de cancer et l'étude de la cellule à l'origine est une thématique complexe qui laisse encore beaucoup de questions sans réponse.

De plus, l'origine des CSCs demeure une question compliquée, l'analogie avec les cellules souches saines laisse imaginer qu'elles seraient le résultat de l'altération de cellules souches en cellules cancéreuses néanmoins elles semblent également pouvoir provenir de cellules plus matures[52], [53] par un procédé de dédifférenciation. Récemment, plusieurs études ont montré que les cellules cancéreuses et les CSCs seraient capables d'une importante plasticité régulée par de multiples facteurs, ce qui leur permettraient de s'adapter à leur environnement[54] Figure 5A. Ce phénomène qui implique d'importantes conséquences cliniques remet alors encore une fois en question les modèles et la récente hiérarchisation des cellules cancéreuses. Les CSCs feraient alors plutôt référence à un état cellulaire dynamique. En outre, sans aborder le sujet de l'origine des CSCs, un degré de complexité supplémentaire a également été décrit : la présence de CSCs présentant des portraits moléculaires hétérogènes au sein d'une même tumeur[55, 56]. Récemment, il a même été montré que dans le contexte de cancers du seins, les CSCs pouvaient également passer d'un phénotype mésenchyme à épithélial par régulation de facteurs épigénétiques ce qui est lié à la propriété d'invasion des CSCs[57,58]. Figure 5B.

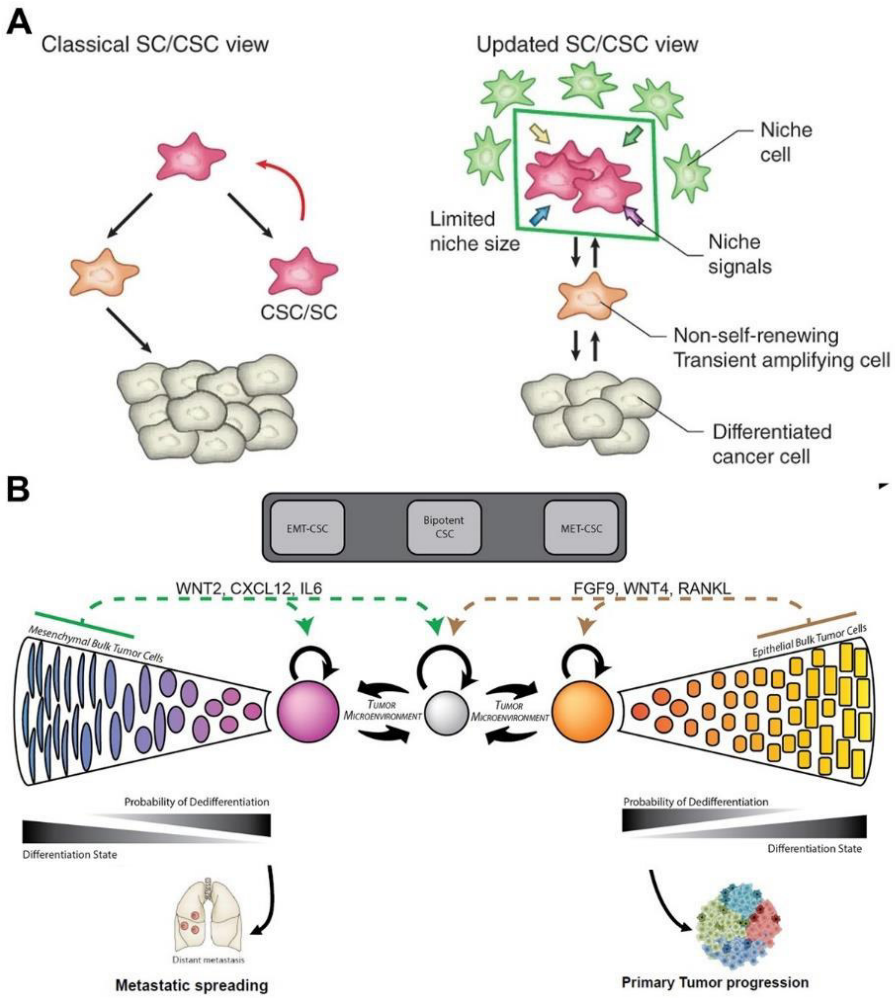


Figure 5 : La plasticité des CSCs. (A) Représentation revisitée du concept de cellules souches cancéreuses, le système hiérarchique à gauche est bouleversée par la plasticité cellulaire, les CSCs sont régulées par les signaux issus de la niche et peuvent avoir pour origine une cellule cancéreuse plus mature qui a subi un processus de dé-différenciation[54] (B) Deux types de cellules souches cancéreuses sont présentes : les cellules mésenchymes et épithéliales adapté de[57].

Ce concept déjà hautement dynamique, complexe et multiparamétriques est probablement amené à évoluer encore. La progression de la prise en charge des patients apparaît indissociable de la compréhension des mécanismes de régulation des propriétés appliquées aux CSCs. En clinique, l'apparition du concept des CSCs et du modèle hiérarchique faisaient des CSCs une cible thérapeutique prometteuse. Ils laissaient penser que même si l'élimination des cellules tumorales permettait d'obtenir la rémission des patients, seule l'éradication complète des CSCs permettrait une guérison complète, les autres cellules cancéreuses ne pouvant pas rétablir la population cancéreuse. Cependant, en ajoutant

le phénomène de plasticité, le problème se complexifie et devient hautement multiparamétrique. Le comportement de ces dernières apparaît donc comme intimement lié aux différents signaux issus de leur microenvironnement qui participent ainsi à la mise en place de processus de résistance. La compréhension de cette régulation par les différents signes de la niche semble donc être la clef pour progresser dans la compréhension du mécanisme de résistance thérapeutique. Cette dépendance au microenvironnement pourrait cependant être absent ou perdu pour certaines tumeurs les plus agressives ou même directement modifié par le protocole thérapeutique mis en place et par l'inflammation[57,59].

Le paragraphe suivant présente de manière synthétique les différentes techniques utilisées pour leur isolation depuis l'apparition du concept.

Difficultés de caractérisation/ isolation des CSCs :

L'étude des cellules souches cancéreuses représentent un défi au vu tout d'abord de la difficulté de leur isolation et caractérisation. Beaucoup d'efforts ont d'abord été effectués pour les isoler à partir de marqueurs moléculaires membranaires reliés à leurs propriétés souches parmi eux, CD133, CD44, epCAM (epithelial cell adhesion molecule)[60]. Leur expression est généralement tissu-dépendant. La séparation est largement effectuée par cytométrie à flux ou tri magnétique[61, 62]. Cependant, malgré un nombre très important d'études, l'utilisation de marqueurs moléculaires est loin de faire consensus même pour un tissu spécifique. L'expression semble déjà ne pas être stable et varier suivant le cycle cellulaire [63]. Ceci amène les chercheurs à combiner plusieurs types de marqueurs[64].

D'autres stratégies basées sur des propriétés fonctionnelles et intrinsèques ont été développées. L'une d'elle est l'utilisation d'un rapporteur de l'activité enzymatique de l'ALDH[65]. Les CSCs présentent une activité renforcée de cette enzyme qui peut être suivi par l'utilisation d'un substrat qui devient fluorescent lorsqu'il est clivé par l'ALDH (ALDEFLUOR assay). Un autre système moins utilisé utilise également un rapporteur d'activité mais cette fois-ci du protéasome[66]. Les CSCs présenteraient une activité réduite de ce dernier. Cette approche sera présentée plus en détails dans le chapitre 2 pour le modèle du glioblastome (2.2). Comme il a déjà été mentionné, les CSCs présentent une activité prononcée des pompes à efflux, participant à leur mécanisme de résistance aux thérapies. Cette caractéristique peut être utilisée pour leur isolation par la méthode de la « side population » qui repose sur l'éviction rapide de marqueurs fluorescents telle que Hoechst 33342[67]. Des analyses fonctionnelles sont également utilisées, l'une d'entre elles repose sur le test de la capacité des cellules immatures à résister à l'apoptose sans ancrage, elle sera présentée plus en détails dans le chapitre 4. Rapidement, elle consiste à isoler les cellules dans des conditions qui empêchent leur adhésion, seules les cellules souches sont alors capables de résister à une apoptose particulière nommée Anoïkis. Un test in *vivo* repose sur leurs deux caractéristiques essentielles : l'autorenouvèlement et la différention. Les cellules sont injectées dans des souris immunodéprimées. L'évaluation consiste ensuite à observer si ces dernières sont capables d'engendrer une tumeur qui reproduit les différentes caractéristiques de la tumeur d'origine et doit pouvoir être effectuée en série. L'injection est parfois effectuée sous-cutanée, ce qui est relativement simple à mettre en place mais ne reproduit pas le microenvironnement de la tumeur initiale. Des transplantations orthoptiques sont également employées afin d'obtenir des conditions plus appropriées.

Les protocoles de culture préconisent généralement d'utiliser exclusivement une culture en 3 dimensions pour préserver le caractère souche des cellules cancéreuses issues de tumeurs solides et dans un milieu de culture dépourvu de sérum (qui contient des composés pro différenciation comme des hormones, cytokines) mais supplémenté en facteurs de croissances[68]. Cependant, aucun protocole standard n'est établi et la variété des composés utilisés complique la comparaison des résultats entre les différentes équipes.

2.4. L'importance du microenvironnement tumoral :

En conditions physiologiques, il existe un équilibre dynamique entre les cellules et les différents éléments issus de son environnement qui ne cesse de communiquer. Lorsqu'un processus tumoral se met en place, cet équilibre est hautement modifié. Il est maintenant évident que la progression tumorale n'est pas seulement l'apparition de cellules génétiquement modifiées, mais que c'est également une modification drastique de l'ensemble du tissu dans lequel elles évoluent. L'environnement tumoral est altéré, il évolue tout au long de l'histoire de la tumeur et participe activement au processus d'échappement thérapeutique. Il est donc important de considérer la tumeur dans toute sa complexité non plus à l'échelle cellulaire, mais à l'échelle tissulaire.

Le stroma ou le microenvironnement tumoral est globalement composé d'une matrice extracellulaire, d'une population très hétérogène de cellules, de molécules immunitaires et d'un réseau vasculaire anarchique Figure 6. Différents types cellulaires sont présents au voisinage de la tumeur avec les cellules constituants le tissu de base et le recrutement de nouveaux types cellulaires[69]. Un dialogue s'établit donc entre la population déjà en elle-même hétérogène de cellules cancéreuses et les différentes cellules (macrophages, cellules mésenchymes, cellules épithéliales, cancer-associated fibroblastes) par interaction directe ou par l'intermédiaire de facteurs solubles (cytokines, chemokynes, exomes, facteurs de croissance…)[70]. La matrice extracellulaire constitue un composant non cellulaire essentiel. Elle est composée de protéines de collagène, protéoglycanes et glycoprotéines et permet l'ancrage des cellules. Les cellules associées au contexte tumoral ne « subissent » pas simplement les signaux issus de la matrice extracellulaire mais participent aussi à son évolution au cours du temps en modifiant sa composition et son architecture[71]. La vascularisation autour de la tumeur est aussi dérégulée, le réseau est désorganisé amenant l'apparition de zones plus ou moins oxygénées. Ceci joue directement sur la libération d'agents thérapeutiques et donc sur les mécanismes d'échappement. L'hypoxie alors rencontrée est également un élément important de la modulation des propriétés cellulaires.

En réalité, là encore l'utilisation du singulier pour désigner le microenvironnement n'est pas correct ; il est plus approprié de parler de microenvironnements au pluriel car suivant la localisation de la cellule au sein du tissu, elle ne reçoit pas les mêmes signaux de l'extérieur. Cet aspect sera présenté un peu plus en détails dans le cadre du cerveau, de la moelle osseuse et du sein dans le chapitre 2. Généralement trois niches ressortent au sein de la tumeur primaire, la niche hypoxique, la niche à l'inverse proche des vaisseaux et celles correspondant à des zones où peut se dérouler d'éventuelles migrations cellulaires. Des niches différentes sont également rencontrées lors de la dissémination tumorale, la cellule est donc amenée à évoluer dans des conditions environnementales très différentes. Il est notamment envisagé que suivant l'appartenance des cellules aux propriétés souches à l'une ou l'autre de ces niches, leur comportement seraient différents et notamment leur état de quiescence.

Face à ces différentes modifications de la composition du microenvironnement tumoral, ses propriétés physiques évoluent également et présentent, elles aussi, une clef dans la régulation des cellules cancéreuses, cet aspect sera abordé dans la dernière partie de ce chapitre.

Fort de ces connaissances, il devient nécessaire d'intégrer le microenvironnement tumoral dans les études de réponses aux traitements anticancéreux. L'analyse des mutations impliquées dans la mise en place tumorale a permis des avancées et notamment des thérapies ciblées améliorant la prise en charge des patients (exemple de la leucémie myéloïde chronique dans le chapitre 2) il apparait désormais indispensable de considérer également l'interaction avec l'environnement pour comprendre des phénomènes de résistance se mettant en place *in vivo*.

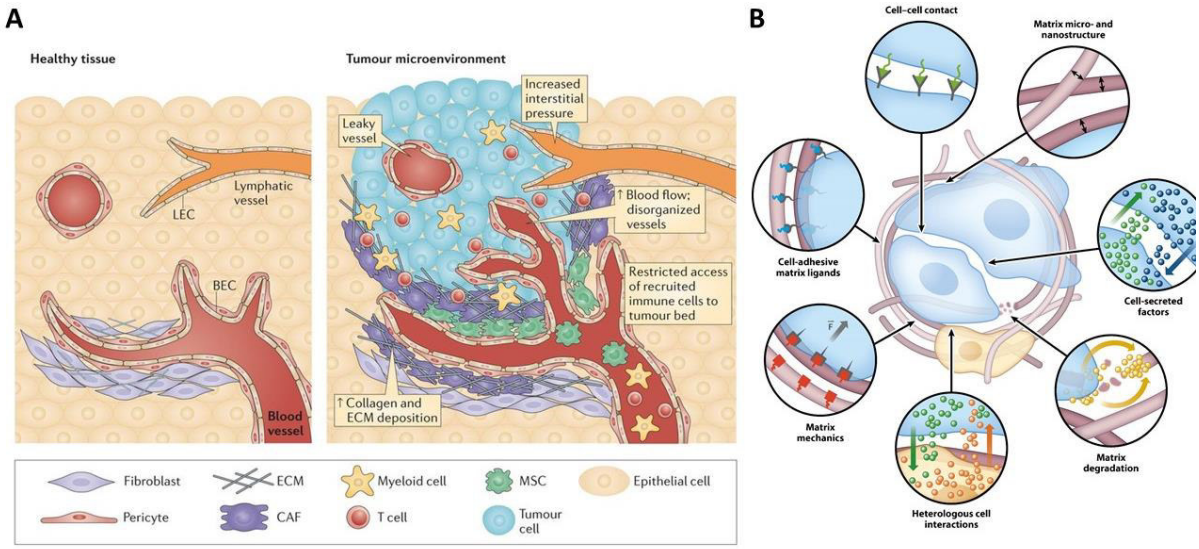


Figure 6 : Les cellules cancéreuses et leurs interactions avec le microenvironnement. (A) La composition cellulaire et l'architecture du microenvironnement sont modifiés dans le contexte tumoral : il apparaît un réseau vasculaire désorganisé, la matrice extracellulaire (ECM) est modifiée, différents types cellulaires sont recrutés : macrophage (MSC), cellule myéloïde, lymphocyte T, cancer associated fibroblastes (CAF) (B) Les différentes interactions de la cellule avec son microenvironnement [359, 360].

3. Contraintes mécaniques et cellules cancéreuses

3.1. Propriétés mécaniques du microenvironnement tumoral

L'évolution du microenvironnement associée à l'histoire tumorale induit des modifications des signaux biochimiques perçus par les cellules mais également des changements des propriétés mécaniques qui influencent le comportement des cellules et participent à la progression et à la résistance tumorale[72]. Ces changements sont principalement la conséquence de modifications des propriétés mécaniques intrinsèques des cellules cancéreuses, d'une altération des caractéristiques physiques de la matrice extracellulaire et de l'expansion rapide de la masse tumorale dans un environnement restreint accompagnés du recrutement de cellules activées[73].

Un premier élément intéressant concerne la rigidité tissulaire augmentée[74]. Ceci résulte principalement d'un remodelage de la matrice extracellulaire dans le contexte tumoral et une concentration augmentée de protéines de collagène, une réticulation plus importante et une réorientation des fibres. Ces éléments induisent une rigidification qui est corrélée à la progression et l'incidence de la tumeur[75]. Cette donnée est notamment utilisée dans le diagnostic avec des techniques non invasives d'échographie ou sonographie traquant les propriétés d'élasticité et de densité[76]. Il a notamment été montré que le changement de propriétés mécaniques de l'ECM influait sur la régulation de la prolifération cellulaire[77], la differenciation[78] et l'expression de gènes ayant un rôle dans l'invasion et la formation de métastases[79]. L'augmentation de rigidité induit le regroupement d'intégrines, l'assemblage des points d'adhésions focaux et l'augmentation de la tension du cytosquelette[74].

Les cellules cancéreuses et les cellules du stroma sont également exposées à différents niveaux et types de forces. La prolifération exacerbée caractérisant la progression tumorale amène une expansion rapide au sein d'un tissu défini. Les forces exercées par cette croissance et la résistance du stroma alentour amènent alors à une augmentation des contraintes mécaniques. Le recrutement et l'expansion des cellules immunitaires et fibroblastes augmentent également cet encombrement. Le terme de « solid stress » est souvent utilisé pour désigner ces contraintes dues aux composants « solide » ou plutôt non liquide du microenvironnement en opposition à celles imposées par les fluides interstitiels et réseau vasculaire[80]. Cependant il semble assez compliqué de diviser strictement le rôle de chacun, ce terme peut donc amener à des imprécisions. Dans le cadre d'une tumeur solide, les contraintes subies par les cellules constituant la tumeur peuvent ensuite être divisées en deux parties[81]. Un 1er type de contraintes s'accumulent lors de la croissance ; elles sont la conséquence d'un remodelage de ces composants structurels et persistent même si la tumeur est retirée de l'organe mais sont libérées par incision[82] Figure 7C. Il est intéressant de noter qu'une part de ces contraintes peut être imputée à la pression des fluides interstitiels, le gonflement de l'acide hyaluronique n'étant pas supprimé lors de l'excision[73]. Un 2ème type de contrainte est dû à la résistance du tissu environnant à l'expansion tumorale (externally applied stress), elle est alors supprimée lorsque la tumeur est retirée du tissu.

Assez récemment, des mesures ont permis de montrer que le type de cancer, la taille de la tumeur et le tissu environnant influaient sur la valeur des contraintes au sein de la tumeur[83]. Ils ont également attesté que cette valeur n'était pas corrélée avec les propriétés d'élasticité du stroma. Les

forces externes générées seraient donc indépendantes des modifications des forces d'adhérence en réponse au changement de rigidité de la matrice. Les forces sont définies comme tensiles en périphérie de la tumeur et compressives au centre.

En parallèle, d'autres forces sont dues aux composants fluides. La pression des fluides interstitiels est augmentée par des fuites du réseau sanguin dues à une perméabilité vasculaire et par un drainage lymphatique réduit[84]. Elle est également la conséquence d'une rétention accrue des fluides par gonflement d'hydrogel présent au sein de la matrice extracellulaire. Cet élément contribue aussi à la résistance de la matrice extracellulaire à la croissance tumorale. De plus, la perméabilité vasculaire est augmentée et peut causer des fuites du réseau sanguin vers l'espace interstitiel. Le drainage lymphatique est réduit par compression des vaisseaux lymphatiques contribuant ainsi à cette augmentation de pression des fluides interstitiels.

Lors du processus métastatique, les cellules cancéreuses sont amenées à envahir le réseau sanguin et à y subir un autre type de forces : les forces de cisaillement. Elles sont dues aux déplacements du fluide sanguin et dépendent donc de sa viscosité et de sa vitesse. Ce dernier élément présente une importante hétérogénéité au sein d'une tumeur caractérisée par un réseau vasculaire hautement désorganisé[80].

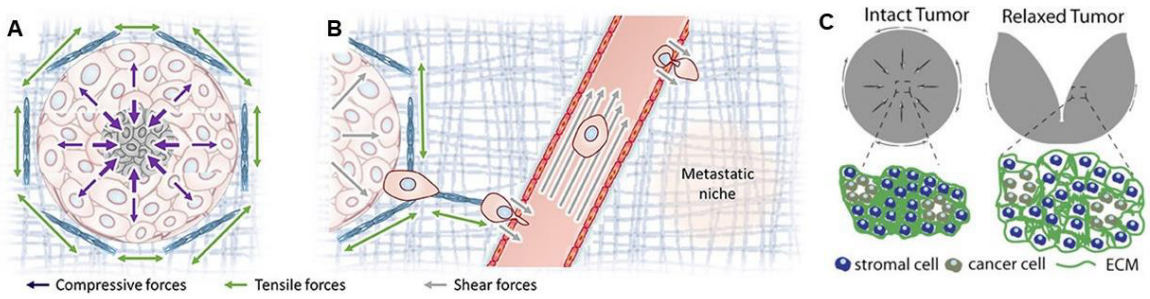


Figure 7 : Divers stimuli mécaniques sont rencontrés dans le tissu tumoral. (A, B) L'expansion tumorale dans un environnement défini compresse la tumeur et le stroma. Avec la dissémination tumorale, les cellules migrent vers le réseau vasculaire et subissent alors des contraintes de cisaillement[73] (C) Représentation des contraintes dues à la croissance, elles sont relâchées après excision de la tumeur [82].

Les tumeurs représentent ainsi un système mécanique complexe et irrégulier qui évolue au cours du développement du cancer et des potentiels effets thérapeutiques. Ces changements ne sont pas sans conséquence sur leur régulation et participent activement au phénomène de résistance.

3.2. Méthodologie pour l'étude de l'impact des contraintes mécaniques

L'impact de la rigidité de la matrice extracellulaire est assez fréquemment analysé, notamment dans le contexte des cellules souches et leur différenciation mais également dans le contexte de la cancérologie, par ajustement des propriétés de substrat ou par inclusion de cellules individuelles ou de structure en 3D dans une matrice à rigidité contrôlée[81]. Le rôle des contraintes mécaniques est relativement moins étudié. Différentes techniques ont été imaginées pour les reproduire *in vitro* et sont résumées sur la Figure 8. Les systèmes en 2D seront présentés plus en détail dans le chapitre 3.

Avec le développement des structures cellulaires tridimensionnelles des outils ont été mis en place pour appliquer des forces mécaniques également sur les sphéroïdes.

Ils consistent généralement à laisser croître les cellules dans un environnement confiné par :

- Inclusion de sphéroïdes dans une matrice à rigidité ajustée : agarose[85–87], PEGA[88]

- Croissance dans un volume défini : canaux en PDMS[89], chambre en PDMS [90]

- Application d'une pression osmotique (solution de Dextran)[91–93]

- Croissance au sein d'une microcapsule[94]

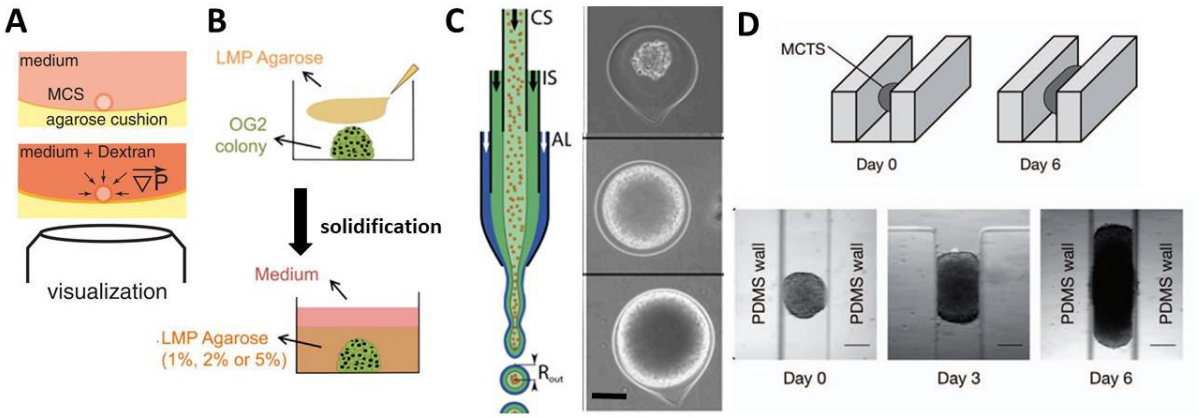


Figure 8 : Application de contraintes mécaniques sur des sphéroïdes. (A) par pression osmotique[91–93] (B) inclusion dans de l'agarose[85–87] (C) Croissance dans une microcapsule déformable[94] (D) Croissance dans un volume défini par des murs en PDMS[89]

3.3. Importance des contraintes mécaniques sur les cellules cancéreuses

Impact des contraintes mécaniques

L'analyse de l'impact des contraintes mécaniques a montré qu'elle pouvait tout d'abord avoir un impact sur la croissance tumorale. Le taux de prolifération cellulaire et l'apoptose étaient altérés aussi bien sur des études au niveau cellulaire par confinement en 2D que sur des études au niveau multicellulaire en 3D où la contrainte est induite par la croissance de sphéroïdes dans un environnement restreint ou par pression osmotique[85, 87, 95] et ceci pour des types cellulaires variés. Cet effet est réversible car la croissance est reprise après libération des contraintes[85] et participe à la modulation de la morphologie tumorale, l'apoptose est induite dans les régions subissant la plus forte contrainte alors que la prolifération est retrouvée pour les localisations à plus faible stimulation[87]. La morphologie cellulaire au sein d'un sphéroïde semble également dépendre des forces de compression, les cellules et les noyaux présentent une orientation et une élongation dans l'axe principal des forces subies[86, 95]. Il a été montré qu'au sein de sphéroïdes contraints, les cellules étaient stoppées en mitose et que ceci était dû à des défauts d'assemblage du fuseau mitotique[89]. La mise en place d'un confinement altère la modification morphologique qui accompagne la cellule qui initie une mitose. Des défauts d'assemblage du fuseau mitotique et de capture des chromosomes sont alors observés et peuvent expliquer un temps de mitose plus important et l'augmentation de divisions asymétriques[96–99]. La croissance ne doit donc plus être vue comme un processus uniquement régulé par des éléments chimiques (nutriments, facteurs de croissance, oxygène …) mais également pas les propriétés mécaniques locales du tissu. Des changements d'expression de gènes associés au processus métastatique et à la transition epithélio-mésenchymateuse ont également été décrits[100].

Les acteurs moléculaires

Les signaux mécaniques peuvent influer sur la structure et le comportement cellulaire, les cellules sont donc capables de sentir ces éléments et de les traduire en signaux biochimiques. Ce phénomène de mécanotranduction est le processus de conversion d'un signal mécanique en un signal biochimique résultant en une réponse cellulaire[101]. Divers éléments sont décrits comme des facteurs de transmission des signaux mécaniques[102]. Parmi eux, YAP (Yes-Associated-Protein) et son cofacteur TAZ sont des facteurs de transcriptions qui peuvent activer leurs gènes cibles lorsqu'ils présentent une localisation nucléaire ou au contraire les inactiver quand leur localisation est cytoplasmique. Des propriétés cellulaires essentielles comme la prolifération et la différenciation ont été décrites comme régulées par ces derniers. Ils semblent ainsi complètement dérégulés dans plusieurs types de cancers[103]. Leurs mécanismes ne sont pas encore entièrement compris et sont probablement multiparamétriques mais l'impact des contraintes mécaniques sur leur action est de plus en plus étudié. YAP est décrit comme étant activé pour des cellules cultivées sur des substrats rigides et sous forces de tension alors qu'il est inactivé pour des substrats mous ou par une forte densité cellulaire[104]. Des résultat récents montrent son rôle dans la résistance thérapeutique, il est donc au cœur des préoccupations actuelles en cancérologie et mécanobiologie ; des molécules qui bloqueraient indirectement son action sont en cours d'études cliniques[105]. D'autres classes de facteurs de transcriptions sont décrits comme des éléments participant au phénomène de mécanotransduction mais également dans le processus de progression tumorale comme les protéines Jun ou Fos, par exemple[101, 106, 107].

3.4. Contraintes mécaniques à l'échelle tissulaire pression homéostatique et compétition cellulaire

A l'échelle tissulaire cette fois, l'impact des contraintes mécaniques peut être abordé en étudiant les notions de pression homéostatique et de compétition cellulaire.

La notion de pression homéostatique a été introduite en se basant sur l'idée que les contraintes mécaniques imposées sur un tissu contrôlent le taux de division cellulaire et l'apoptose et qu'il existerait alors un état stable de pression où les deux seraient parfaitement équilibrés. Une expérience théorique de cette idée est représentée en Figure 9A : la pression exercée mesurée par le piston serait alors la pression homéostatique du tissu. Si l'on remplace le piston par un autre tissu un phénomène de compétition cellulaire rentre alors en jeu entre les deux compartiments. Cette notion fait appel à un processus qui induit l'élimination progressive d'une population cellulaire au bénéfice d'une autre par apoptose[108]. Elle fut introduite chez la drosophile mais se transmet très bien dans le contexte tumoral[109]. Quelles sont les mécanismes qui permettent à la tumeur de croître dans un tissu déjà encombré et de « gagner » cette compétition l'opposant aux cellules du tissu initial ? Les cellules cancéreuses semblent utiliser ce phénomène de « compétition cellulaire » pour éliminer les cellules du microenvironnement et libérer de l'espace pour leur croissance.

Ce phénomène est encore largement incompris mais les contraintes mécaniques semblent avoir un rôle dans l'élimination des cellules du tissu "perdant". La différence de tension corticale et donc les propriétés intrinsèques des cellules pourraient renter en jeu et induire cette différence de prolifération et conduire à cette compétition entre les différentes populations[110].

Les forces mécaniques imposées par la croissance influeraient sur la compétition cellulaire par : induction d'apoptose par force de compression, élimination de cellules par modification géométrique et activation de prolifération des cellules « gagnantes » par forces de tension.

Ce mécanisme est encore théorique, cependant les facteurs connus comme nécessaires pour établir une compétition cellulaire entre deux tissus semblent être tous réunis dans le cas du cancer : présence de forces mécaniques, d'apoptoses, de différence de prolifération entre les populations cellulaires et variations dans leur sensibilité aux contraintes. Des études ont déjà montré que les cellules, suivant si elles sont transformées ou non, répondent différemment à la compression.

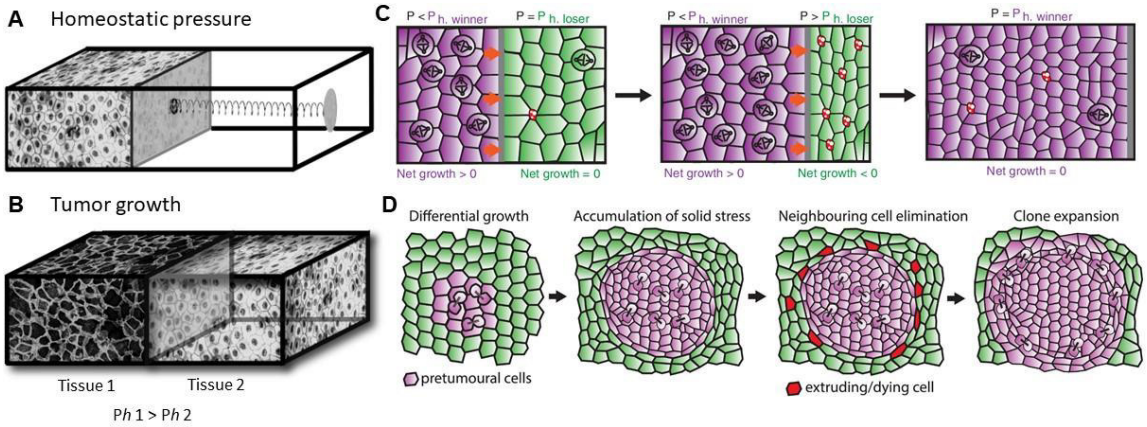


Figure 9 : Pression homéostatique et compétition cellulaire. (A) Le tissu croît contre un mur déformable relié à un piston, la croissance s'arrête jusqu'à obtenir équilibre, à la pression homéostatique du tissu ou, où le taux de prolifération et de mort cellulaire sont équilibrés. (B,C,D) Les tissus T et H présentent des pressions homéostatiques différentes, lorsque la pression homéostatique du tissu H est atteint il stoppe sa croissance alors que le tissu T continue la pression dépasse alors la pression homéostatique du tissu H, son taux d'apoptose augmente et ceci continue jusqu'à complète élimination de ce dernier adapté de[361, 362].

L'impact de contraintes mécaniques sur différentes populations cellulaires pourrait ainsi permettre d'avancer dans la compréhension de ce mécanisme qui semblerait jouer un rôle important lors du développement cancéreux. Comprendre comment les cellules cancéreuses arrivent à gagner cette compétition tissulaire pourrait permettre d'envisager des thérapies qui n'induisent plus la mort cellulaire qui ne fait que libérer de la place pour une seconde phase de progression cancéreuse mais plutôt stopper leur expansion ou idéalement complètement renverser le processus.

Présentation du projet de thèse

Tout au long de ce premier chapitre d'introduction, nous avons vu que plusieurs aspects peuvent expliquer l'échec des thérapies actuelles à apporter une guérison complète et au plus grand nombre de patients victimes de cancers. Les résultats et les modèles étudiés sont de plus en plus complexes et multiparamétriques et nous amènent à repenser la tumeur d'une manière beaucoup plus globale. Il semble maintenant primordial de s'intéresser à une sous-population de cellules cancéreuses présentant des caractéristiques de cellules souches et une incroyable plasticité. Leur régulation apparaît comme intimement liée à leur microenvironnement, il est donc nécessaire d'intégrer des paramètres qui étaient dans un premier temps ignoré dans les modèles d'études. Parmi eux, il existe de plus en plus de preuves que la mécanique joue un rôle important dans la transformation maligne des cellules et dans la progression, dissémination mais aussi la résistance de la tumeur[111]. La compression subie à la fois par les cellules cancéreuses mais également par les cellules environnantes augmente drastiquement lors de la progression tumorale. Inversement, sous l'effet des traitements, la majorité de la masse tumorale est éradiquée conduisant à la disparition brutale de ces contraintes. Ce phénomène non physiologique n'est certainement pas sans conséquence pour le tissu et les cellules le composant. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse.

Ma thèse expérimentale s'est divisée en deux parties. La 1ère partie est issue d'une collaboration de l'équipe biophysique de l'Institut Lumière Matière (ILM) avec une équipe du Centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL) « BMP, niche tumorale & résistance » dirigée par le docteur Véronique Maguer-Satta. Ces derniers étudient le rôle de l'environnement sur le comportement et la résistance aux traitements de cellules cancéreuses immatures, en utilisant des modèles de tumeurs épithéliales et hématopoïétiques. Ils désirent intégrer de plus en plus les paramètres physiques à leurs modèles biologiques et c'est là que réside tout l'enjeu du troisième chapitre. Un système de confinement cellulaire à deux dimensions a été développé afin de répondre au besoin d'une analyse à long terme de l'impact des signaux mécaniques sur le comportement cellulaire. Deux modèles biologiques sont utilisés dans ce chapitre : la Leucémie Myéloïde Chronique et le cancer du sein présentés dans le chapitre 2.

La deuxième partie concerne un modèle de culture cellulaire en 3D : le sphéroïde. Un deuxième microsystème a été développé, cette fois-ci pour permettre la production et l'analyse de sphéroïdes à moyen débit. Il est détaillé dans le quatrième chapitre de cette thèse. Des études ont été menées en collaboration avec une autre équipe du CRCL pour cette partie, « Diversité du transcriptome des cellules souches » du Dr Mathieu Gabut sur un type de cancer cérébral très agressif : le glioblastome.

Avant de rentrer dans la présentation de ces deux microsystèmes et des résultats obtenus, le chapitre suivant va permettre d'introduire les différents modèles biologiques utilisés et un élément clef partagé par ces deux outils : l'agarose. Un hydrogel encore peu utilisé en microfluidique mais qui présente de véritables atouts pour l'utilisation en culture cellulaire.

Chapitre 2 : Les acteurs

Ce chapitre est consacré à l'introduction des différents acteurs qui entrent en jeu dans la suite de l'étude. Dans un premier temps, les différents modèles biologiques utilisés et les différents projets associés sont présentés. Le contexte de ce type de cancer, le microenvironnement tumoral associé et le modèle des cellules souches cancéreuses sont exposés pour chaque cas. La dernière partie est quant à elle réservée à la présentation et à la caractérisation du constituant majeur des deux microsystèmes développés : l'agarose.

1. Modèles biologiques utilisés dans le chapitre 3

1.1. La leucémie Myéloïde Chronique

Généralité sur les leucémies :

Les leucémies avec les lymphomes, constituent des types de cancer dits « liquides ». En 2018 et d'après les données de Globocan 2018, les leucémies se classent au 12ème rang par leur incidence et 10ème par leur mortalité. Elles peuvent survenir à tout âge, mais sont plus fréquemment rencontrées chez les jeunes enfants, elles représentent à elles seuls 30% des cancer pédiatriques, d'après l'Organisme Mondiale pour la Santé, ou les personnes de plus 55 ans Figure 11.

Ce sont des maladies hématologiques caractérisées par un nombre anormalement élevé de globules blancs dans le sang. Cette augmentation est due à une dérégulation du processus physiologique se déroulant dans la moelle osseuse : l'hématopoïèse, littéralement « fabrication du sang ». Cette dernière est responsable de la production et du perpétuel remplacement des différents éléments sanguins. Certaines de ces cellules ont une durée de vie très courte, la moelle osseuse est donc un tissu hautement prolifique[112]. Ce mécanisme hiérarchisé est représenté Figure 10.

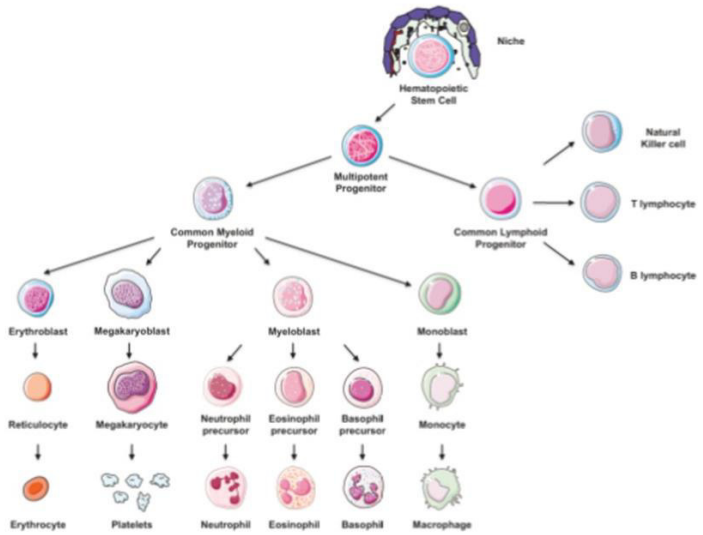


Figure 10 : Hématopoïèse : de la cellule souche hématopoïétique aux composants matures du sang. Représentation schématique du processus hiérarchisé du développement des différentes cellules sanguines. Les cellules souches hématopoïétiques induisent deux types de cellules progénitrices majeures : myéloïde et lymphoïde donnant respectivement les érythrocytes, plaquettes, neutrophiles éosinophiles, basophiles et macrophage et les cellules « Natural killer », lymphocytes B et T, issu de[113].

A l'origine des différentes lignées hématopoïétiques, se retrouve une petite fraction de cellules souches pluripotentes hématopoïétiques, qui se spécialisent progressivement en cellules multipotentes progénitrices puis en précurseurs et finalement en cellules matures. Ce processus de formation organisé de manière hiérarchique est l'un des plus anciennement étudiés du corps humain, un nombre important de marqueurs de surface ont été observés pour classer les différents compartiments[114], des hétérogénéités dans la population des cellules souches hématopoïétiques ont également été décrites et compliquent le modèle de base[115].

Les cancers liquides apparaissent lorsque des défauts sont présents dans ce processus d'hématopoïèse. Ils sont ensuite classifiés en différentes sections suivant le phénotype des cellules prolifératives dominantes et leur vitesse d'évolution. Les leucémies aiguës sont caractérisées par une progression très rapide et une accumulation importante de cellules immatures alors que les leucémies chroniques présentent une évolution plus lente et une augmentation de cellules plus matures. Les cellules affectées peuvent appartenir à la lignée des cellules myéloïdes ou lymphoïdes. Quatre catégories en ressortent donc suivant ces deux principales caractéristiques : les leucémies aiguës myéloïdes ou lymphoïdes et les leucémies chroniques également myéloïdes ou lymphoïdes.

Dans la suite de ce manuscrit, l'accent sera mis essentiellement sur la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC).

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) :

La LMC représente autour de 15% des leucémies diagnostiquées dans le monde, elle peut survenir à tout âge mais ne représente qu'une faible part des leucémies pédiatriques Figure 11. L'âge médian de diagnostic est de 65 ans. Les causes sont encore inconnues, le seul facteur de risques actuellement démontré est une exposition importante aux radiations[116]. La pathologie connaît classiquement une progression triphasique ou biphasique[117]. Une première période stable dite « phase chronique » qui peut perdurer plusieurs années est suivie d'une phase d'accélération, instable, qui s'apparente alors aux leucémies dites aiguës.

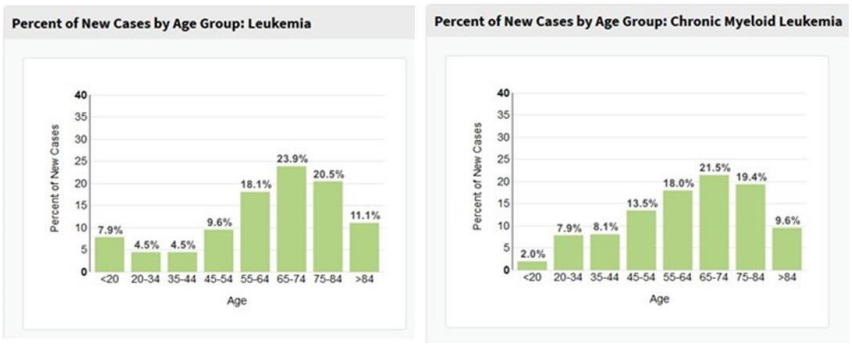


Figure 11 : Incidence des leucémies en fonction de l'âge la population des Etats-Unis, 2012-2016 NIH [118].

La leucémie Myéloïde Chronique constitue un cas modèle pour plusieurs aspects. C'est la première forme de cancer reliée directement à une anomalie chromosomique unique, persistante et clairement définie : une translocation équilibrée et réciproque entre les chromosomes 9 et 22 (connu sous le nom de chromosome de Philadelphie découvert en 1960[119]). Cette recombinaison induit la formation d'un oncogène de fusion Bcr-Abl (Breakpoint cluster region-Abelson) résultant à son tour en une oncoprotéine du même nom : une tyrosine kinase dérégulée qui résulte en une croissance leucémique. Elle est impliquée dans plusieurs processus cellulaires majeurs (prolifération, différenciation, échappement à l'apoptose) par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation[120]

et altérant drastiquement les fonctions cellulaires. Elle ne bloque pas la différenciation cellulaire mais confère un avantage prolifératif important.

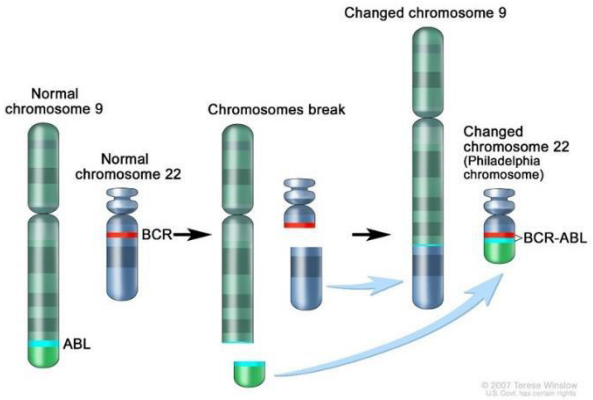


Figure 12 : Formation de l'oncogène Bcr-Abl par translocation chromosomique. Une translocation t(9 ;22) caractéristique des leucémies Myéloïdes Chroniques induit la fusion du gène Abelson du chromosome 9 avec le gène Bcr (Breakpoint cluster region) du chromosome 22. Ceci résulte en la formation de l'oncogène de fusion Bcr-Abl directement responsable de la transformation leucémique des cellules, issu de[121].

L'expression de cette protéine est suffisante pour conduire à des désordres myéloprolifératifs s'apparentant à la LMC chez les souris[122]. Cependant, il n'est pas encore clair, à notre connaissance, si ce réarrangement chromosomique est, à lui seul, l'élément initiateur. Certaines études suggèrent que cette aberration chromosomique est le résultat d'une cassure simultanée des chromosomes 9 et 22 qui pourraient être rapprochés durant l'interphase[123], tandis que d'autres proposent l'hypothèse qu'elle est la conséquence d'instabilités génétiques déjà existantes[124]. Des mutations somatiques ou des évènements épigénétiques s'accumulant a posteriori seraient aussi nécessaires pour expliquer la transition entre les différentes phases de la maladie[117].

Les leucémies représentent également les premiers exemples où l'existence d'une organisation hiérarchisée des cellules cancéreuses avec pour origine les cellules souches cancéreuses a été démontrée[46]. Leurs origines semblent être hétérogènes ; elles peuvent être dues à une transformation des cellules souches hématopoïétiques ou de progéniteurs pour lesquels des propriétés souches et capacité de renouvellement ont été réactivées[125 , 126].

LMC, thérapie génique et résistance :

En outre, la LMC est le modèle princeps du développement de thérapie ciblée. Le premier inhibiteur de tyrosine kinase (connu sous le nom d'Imatinib, Gleevec ou STI-571) a été mis au point au milieu des années 90 afin de bloquer spécifiquement l'activité de l'oncoprotéine Bcr-Abl. Brièvement, l'imatinib vient se lier au site catalytique de la tyrosine kinase, inhibe la liaison de l'adénosine triphosphate (ATP) par compétition directe et stabilise une forme inactive de Bcr-Abl[127] Figure 13.Très rapidement, il constitua le traitement de référence de la LMC, induisant le blocage de phosphorylation de plusieurs substrats, l'inhibition de divers signaux mitotiques, le rétablissement de la sensibilité à l'apoptose et la baisse de l'instabilité génétique pour les cellules Bcr-Abl+ tout en présentant une très faible toxicité pour les cellules Bcr-Abl-. Cette thérapie ciblée demeure un exemple remarquable de la réussite de la mise au point de molécules sélectives. Son efficacité inédite en phase chronique a permis à la LMC de devenir la première catégorie de cancer où un traitement thérapeutique permet au patient de retrouver une espérance de vie normale.

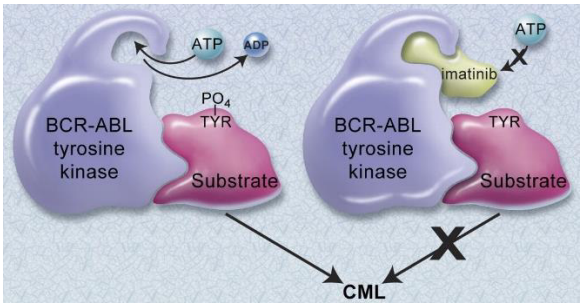


Figure 13 Représentation simplifiée du mécanisme d'action de l'imatinib. A gauche : La liaison de l'ATP est essentielle pour la phosphorylation de substrats de forme active de la tyrosine kinase Bcr-Abl, qui vont ensuite activer diverses voies de signalisations et mener à la LMC. A droite : L'imatinib bloque la liaison de l'ATP, stabilise la forme inactive de la tyrosine kinase et inhibe son action. Issu de [128]

Cependant, la LMC a également constitué le premier modèle de l'étude des mécanismes de résistance thérapeutique. Un tiers des patients n'ont pas répondu correctement au traitement ou ont dû stopper le traitement en raison d'effets secondaires non tolérables. Différents phénomènes ont été décrits : ils sont liés à des variations de mécanismes cellulaires intrinsèques ou extrinsèques[129]. Des mutations de la tyrosine kinase Bcr-Abl peuvent par exemple expliquer l'inaction de l'Imatinib, elles ne sont pas induites par le traitement mais surviennent sur de petites proportions de cellules ensuite sélectionnées par leur capacité de survie. Une surexpression de l'oncoprotéine peut également rendre inefficace l'action de la thérapie ciblée. Des processus plus classiquement connus, comme l'augmentation d'efflux ou la baisse de l'influx des molécules ont également été observés et peuvent restreindre l'action de la thérapie. Cependant, les mécanismes de résistance, probablement souvent multifactoriels, ne sont pas encore tous décrits et connus[130].

La LMC est également l'exemple pionnier de l'analyse de persistance des CSCs. En effet, aucun des inhibiteurs de tyrosine n'est curatif, ils nécessitent un traitement continu. Les cellules indifférenciées Bcr-Abl+ ne sont supprimées par aucun des inhibiteurs de tyrosine kinase et demeurent dans la moelle osseuse des patients même après une longue période de rémission. Ils constituent vraisemblablement le point de départ des rechutes et leur présence expliquent la progression de la maladie observée après arrêt de traitement[131–133].

Cellules souches hématopoïétiques, moelle osseuse et microenvironnement :

En conditions physiologiques, les cellules souches hématopoïétiques jusqu'aux précurseurs, sont limitées à la moelle osseuse (leur présence dans le sang n'est pas totalement exclue mais reste rare), alors que les cellules matures composent exclusivement le sang. Chez l'adulte, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse dite « rouge » (par opposition à la moelle « jaune » graisseuse), du crâne, du sternum, des vertèbres, du fémur, des côtes ou encore du pelvis Figure 14. Ce processus est finement contrôlé par des mécanismes intrinsèques aux cellules mais également par des signaux extrinsèques issus du microenvironnement. La moelle osseuse est un tissu riche et complexe, hautement vascularisé et innervé et présentant une hétérogénéité cellulaire et moléculaire importante. Les cellules présentes sont issues de la lignée hématopoïétique mais aussi d'une lignée mésenchyme composée de cellules souches mésenchymateuses et de leurs dérivés plus matures comme les adipocytes, ostéoblastes, ostéoclastes et cellules endothéliales. Des « sous-niches » distinctes de cellules souches hématopoïétiques se détachent ensuite par leurs composition et localisation. La niche endostéale est à l'interface entre la structure osseuse et la moelle et est principalement composée de cellules ostéoblastiques à différents niveaux de maturation. Elle est dense et présente une quantité importante de fibronectine. Des cellules souches hématopoïétiques sont également présentes proches du réseau vasculaire, de l'endostenum ou plus au centre de la moelle osseuse[134].

Outres les compositions biologiques hétérogènes, les différentes localisations présentent également des gradients de signaux biochimiques et des propriétés physiques très différentes qui influent sur le comportements des cellules souches[135]. La moelle osseuse est un tissu visqueux confiné par les barrières osseuses, qui possède un environnement mécanique varié et qui peut être affecté par des facteurs externes comme le flux sanguin, l'activité, l'âge et certaines pathologies[136].

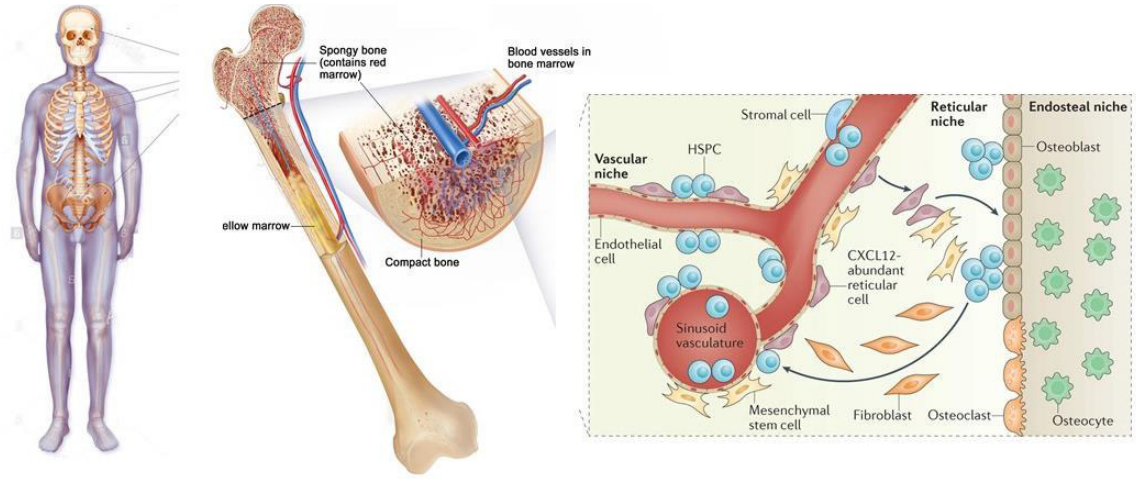


Figure 14 : Représentation du microenvironnement des cellules souches hématopoïétiques. (A, B) l'hématopoïèse se déroule chez l'adulte dans la moelle osseuse « rouge » (C) Deux niches hématopoïétiques se distinguent : la niche vasculaire et la niche endostéale, elles participent à la régulation des cellules souches. Modifié de[137].

Ces diverses niches hématopoïétiques complexes, dynamiques et multiparamétriques régulent plusieurs fonctions essentielles des cellules hématopoïétiques immatures[138]. Les cellules souches mésenchymateuses, tout d'abord, jouent un rôle central dans cette régulation[139]. Elles participent activement à la mise en place de la matrice extracellulaire, sécrètent des facteurs de croissance, cytokines, inhibent les fonctions immunitaires et contribuent à définir les propriétés biochimiques et physiques du microenvironnement[140]. Les paramètres physiques comme la géométrie, la rigidité et l'adhésion ont déjà été décrits comme facteurs d'influence du comportement et notamment la différenciation des cellules souches hématopoïétiques mais aussi mésenchymes[141].

LMC, moelle osseuse et microenvironnement :

Dans le cadre de la LMC, la pathologie résulte d'une altération chromosomique mais de plus en plus d'études s'accordent à dire que le microenvironnement jouerait un rôle dans l'émergence et la maintenance du processus leucémique. Les échanges indispensables aux cellules souches hématopoïétiques saines pourraient être détournés au profit des cellules cancéreuses et notamment des cellules souches leucémiques[142]. Parallèlement aux cellules hématopoïétiques immatures saines, ces dernières se retrouvent également dans les niches vasculaires et endostéales et peuvent donc interagir avec tous les éléments les composant. De plus en plus de mécanismes liés au microenvironnement se révèlent jouer un rôle dans la régulation et la protection des cellules souches leucémiques[143]. Il apparaît comme largement réarrangé et compromet l'hématopoïèse physiologique en mettant en place une niche leucémique[144].

Les propriétés physiques du microenvironnement sont profondément altérées dans le contexte tumoral. La transformation Bcr-Abl typique de la LMC induit une prolifération excessive de cellules souches au sein de leur microenvironnement ce qui pourrait conduire à un confinement accru des cellules cancéreuses mais également de tous les types cellulaires présents dans la moelle osseuse. La pression dans la moelle de patients leucémiques a été décrite comme 10 ou 20 fois supérieure à celle

des personnes saines. Cependant, l'impact des signaux mécaniques sur les cancers liquides reste largement incompris. Un groupe a montré un effet de la pression appliquée sur les cellules, sur leur résistance à un agent thérapeutique[145] dans le cadre de leucémie myéloïde aiguë. Comprendre les potentiels divergences d'effets sur les différents types de leucémies présentant des mutations différentes restent également à éclaircir. Par ailleurs, des études ont déjà montré que la rigidité du substrat pouvait influer sur la prolifération et la résistance de cellules leucémiques aux agents anti-cancéreux[146] et l'effet semble différent selon chaque type de leucémie.

Il est également intéressant de noter que les propriétés physiques intrinsèques des cellules leucémiques diffèrent des cellules hématopoïétiques saines ce qui pourrait altérer les réponses aux stimulations externes. Pour les tumeurs solides, on retrouve généralement une rigidité moins importante des cellules cancéreuses en comparaison aux cellules saines, à des cellules de grades antérieurs ou après l'induction d'oncogène[147–149]. Au contraire, des rigidités supérieures ont été constatées pour les cellules leucémiques myéloïdes et lymphoblastiques[150, 151]. Une hausse est également décrite chez les cellules résistantes aux chimiothérapies[152, 153].

Le projet :

C'est dans ce contexte multiparamétrique qu'une collaboration avec le groupe de recherche de Véronique Maguer-Satta a débuté. Cette équipe étudie notamment les mécanismes de résistances dans le contexte des LMC en évaluant particulièrement l'implication de l'environnement tumoral.

L'objectif est donc d'apporter un paramètre supplémentaire à leurs modèles en intégrant des forces de compression pour mimer les contraintes subies *in vivo*. L'idée est donc d'étudier l'impact des contraintes mécaniques sur différentes lignées cellulaires dont disposent l'équipe du CRCL pour modéliser la LMC. Trois d'entre elles sont utilisées dans cette étude : deux lignées de cellules immatures hématopoïétiques : les TF1-GFP et TF1-BA et une lignée de cellules mésenchymes : les HS27A. Les cellules TF1-GFP et TF1-BA ont été obtenues après transfection de la lignée cellulaire hématopoïétique immature TF1, respectivement par un vecteur contrôle ne portant que la protéine fluorescente GFP (TF1-GFP) et par un vecteur portant la GFP fusionnée à l'oncogène Bcr-Abl à l'origine de la leucémie myéloïde chronique (TF1-BA) Figure 15.

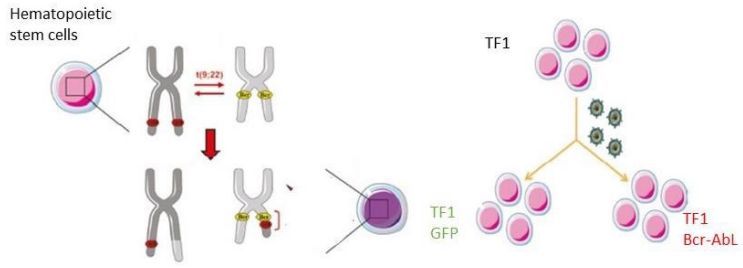


Figure 15 : Cellules souches leucémiques et construction de lignées. A gauche : les cellules souches leucémiques caractéristiques de la CML sont issues d'une altération génétique t(9,22) des cellules souches hématopoïétiques. A droite : les lignées TF1-GFP et TF1-BA sont issues d'une transfection par rétrovirus de la GFP seule ou accompagnée de l'oncogène Bcr-Abl[113]

Ces lignées sont des modèles de choix dans l'étude de mécanismes de la leucémie myéloïde chronique et de cellules souches cancéreuses. Ils permettent d'examiner directement le rôle de l'expression de Bcr-Abl sur des cellules souches en comparant directement à son contrôle qui ne l'exprime pas.

1.2. Le cancer du sein

Un autre modèle biologique utilisé dans cette partie est celui du cancer du sein.

Généralité sur le cancer du sein :

Le cancer du sein est l'un des deux types de cancer les plus diagnostiqués dans le monde, ex-aequo avec le cancer du poumon (données Globocan 2018 Figure 16). Il représente à lui seul 24 % des nouveaux cas de cancer diagnostiqués chez la femme, ce qui en fait la classe la plus fréquente du sexe féminin (le cancer colorectal et le cancer du poumon deuxième et troisième représentent respectivement 9% et 8%). A noter cependant qu'il n'est pas totalement à exclure chez l'homme mais il reste très rare et représente moins de 1% des cas de cancer du sein. Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés : des génétiques et des non génétiques. Les mutations responsables les plus connus et les plus répandus concernent BRCA 1 et BRCA 2 ; ils augmentent les risques de 65 à 85 % chez les porteuses de la mutation[154]. Une consommation excessive d'alcool et la prise d'hormones lors de la ménopause sont des risques avérés ; alors que la contraception orale, le tabac et l'obésité montrent des résultats très incertains[155, 156].

Les thérapies actuelles font appel aux techniques classiques de chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie mais également à l'hormonothérapie et à quelques outils de thérapie ciblée. Une baisse du taux de mortalité a été permise notamment grâce aux améliorations des méthodes de dépistage, permettant désormais une détection en phase précoce dans la majorité des cas. Néanmoins, certaines pathologies continuent à avoir un mauvais pronostic.

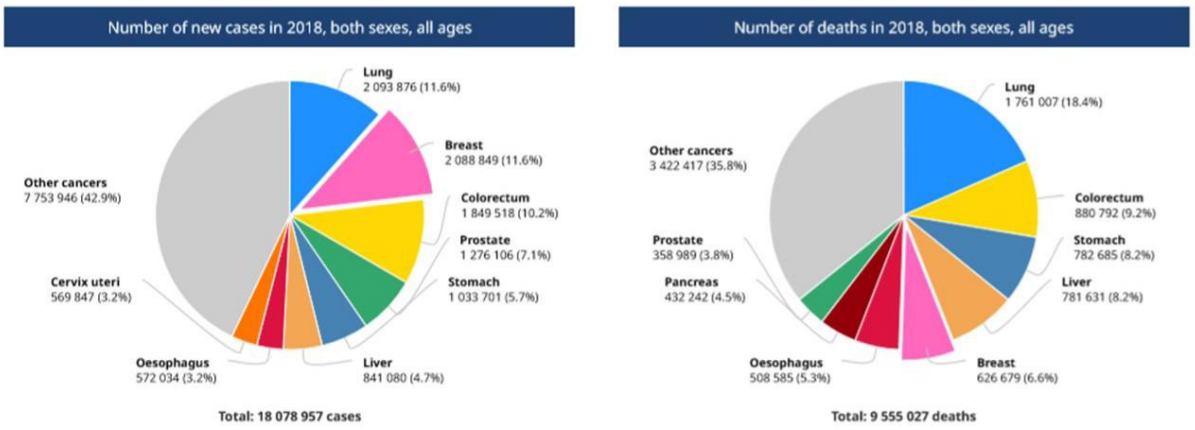


Figure 16 : Incidence et nombre de décès du cancer du sein, au niveau mondial, pour les deux sexes, à tous les âges (Globocan 2018). Le cancer du sein représente la part la plus importante des nouveaux cas diagnostiqués en 2018, ex-aequo avec le cancer du poumon (11.6%), il est classé 5ème concernant le nombre de décès en 2018 avec 6.6%[157].

Différentes études ont tenté d'expliquer les grandes variations observées dans le devenir des patientes. En particulier, de lourds programmes d'analyses moléculaires ont permis de définir trois grands groupes de cancer du sein : les tumeurs luminales, basales et HER suivant l'expression de récepteur d'œstrogènes, de la progestérone ou de surexpression d'un facteur de croissance épidermique humain[158]. Ainsi, le terme « cancer du sein » englobe en réalité un ensemble de pathologies diverses. Elles affectent le même organe et proviennent de la même structure anatomique mais des caractéristiques différentes non seulement génomiques, transcriptomiques, épigénétiques,

mais également cellulaires sont identifiées. La réponse aux traitements et le pronostic clinique des différentes classes, y compris dans le même sous-type, restent assez souvent imprévisibles.

La très grande majorité des cancers du sein touche les cellules épithéliales des glandes mammaires, dans les canaux et/ou bien dans les lobules Figure 17. Ils sont qualifiés d'infiltrant lorsque les tissus périphériques sont aussi atteints et l'on parle d'envahissement ganglionnaire lorsque les ganglions axillaires, situés sous le bras, sont également touchés.

CSC, microenvironnement et cancer du sein :

Le sein normal est constitué de plusieurs canaux composés d'une couche de cellules épithéliales canulaires entourées de cellules myoépithéliales. Elles sont toutes deux issues de l'arbre de différenciation des cellules souches mammaires Figure 17B et C. Le microenvironnement est composé de matrices extracellulaires et de plusieurs types de cellules stromales comme les fibroblastes, les adipocytes et les cellules épithéliales Figure 17B. Ce stroma participe activement à la régulation des propriétés fonctionnelles du sein, en effet, ce tissu est voué à se métamorphoser plusieurs fois au cours de la vie d'une femme, avec la puberté, la ménopause, la grossesse et l'allaitement. Il est maintenant établi que ce microenvironnement joue également un rôle clé dans la progression et la résistance tumorale, il est décrit comme étant lui-même dérégulé à l'apparition de pathologies[159].

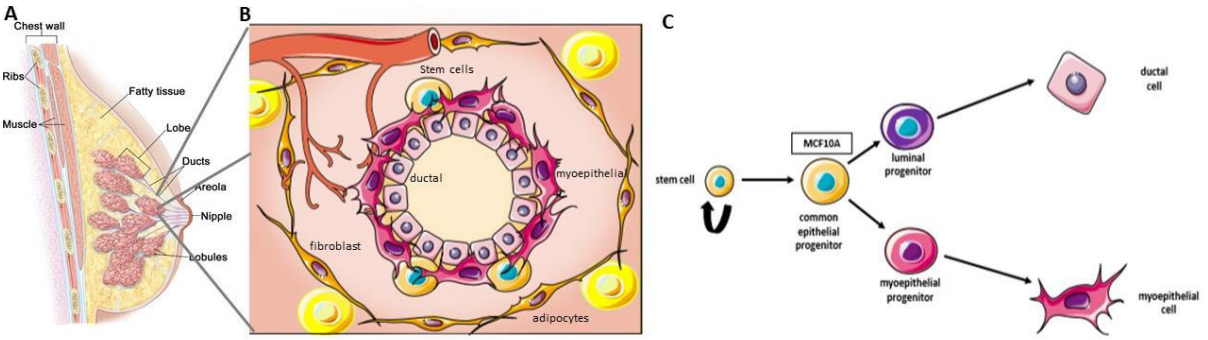


Figure 17 : Le sein et son microenvironnement (A) Représentation de l'anatomie du sein (B) Le microenvironnement (C) Arbre de différenciation des cellules souches mammaires. Adapté de[160]

Les propriétés mécaniques du tissu sont également drastiquement modifiées. La matrice extracellulaire est modulée et promeut la progression des cellules cancéreuses[161]. De plus, même si nous ne sommes pas dans le cas d'un tissu confiné dans une enceinte osseuse comme pour la LMC et la moelle osseuse, le tissu mammaire n'est pas extensible à l'infini et une prolifération cellulaire excessive ou au contraire une suppression rapide après thérapie n'est pas sans conséquence sur les contraintes mécaniques. Ces dernières contribuent ensuite certainement au remodelage de l'environnement et peuvent avoir un rôle dans l'évolution de la maladie. De façon intéressante, des données récentes suggèrent la survenue préférentielle des tumeurs du sous-type basal chez des femmes jeunes et présentant une histologie de la glande mammaire très fibreuse à haute densité tissulaire[162]. Ce risque lié à la densité cellulaire semble s'accompagner de l'augmentation d'un contexte inflammatoire[163].

Le concept de cellules souches cancéreuses a également été appliqué aux différents types de cancers du sein[164].

Le projet :

L'objectif du projet est ici d'utiliser le système de confinement cellulaire sur un modèle de cancer solide, en utilisant encore une fois des modèles biologiques mis au point par l'équipe de Véronique Maguer-Satta. Dans ce manuscrit, les études se cantonneront exclusivement aux cellules souches mammaires saines : les MCF10A. Cette lignée, naturellement immortalisée, est non transformée et décrite comme progénitrice des sous-types épithéliales mammaires Figure 17. Par la suite, Il est prévu d'analyser l'effet des stimulations mécaniques sur des modèles très pertinents de l'évolution du cancer du sein (notamment à un stade précoce), développés par l'équipe du CRCL à partir de ces mêmes cellules MCF10A. Cette lignée cellulaire est également une des lignées les plus utilisées dans les études biomécaniques par rapport aux cellules hématopoïétiques ; ceci nous permettra de confronter nos résultats plus aisément avec la littérature et d'évaluer l'utilisation de notre système de confinement avec des cellules épithéliales adhérentes.

2. Modèles utilisés dans le chapitre 4 :

Deux types cellulaires distincts ont été utilisés dans cette partie. Le premier est une lignée cellulaire colorectale utilisée en routine (HCT116) dans notre équipe tandis que le deuxième concerne une lignée primaire de glioblastome (cancer létal du cerveau), mise au point par l'équipe du CRCL dirigée par Mathieu Gabut, « Diversité du transcriptome des cellules souches ».

2.1. La lignée cellulaire HCT116

Cette lignée cellulaire de cancer colorectal humain notée HCT116 est fréquemment employée en cancérologie. Le cancer colorectal est un des cancers les plus fréquents dans les pays européens, les facteurs environnementaux (manque d'activité physique, alimentation) sont accusés d'être responsables d'un grand nombre de cas. Des formes familiales sont également présentes liées à des mutations génétiques spécifiques héréditaires[165]. La prise en charge est constituée principalement de chirurgie, chimiothérapie et suivant les mutations de thérapie ciblée. 50% des cas présentent encore actuellement une récidive. Deux options possibles semblent faire consensus concernant les cellules à l'origine : des cellules souches de la base de la crypte intestinale qui permettent le renouvellement incessant des cellules colorectales ou des cellules plus différenciées (+4 niveaux de différenciation)[166]. En 2007, il a été montré qu'il existait des cellules souches au sein des cultures d'HCT116[167]. Plusieurs études utilisant différentes méthodes ont permis de caractériser une sous population souche au sein de la lignée cellulaire HCT116 par différents marqueurs (CD 133, CD 26, CD 44) ou propriétés fonctionnelles (tumorigénicité, ALDH) qui sont enrichis après chimiothérapie[168].

2.2. Le Glioblastome

Généralité sur le glioblastome :

Le glioblastome (ou glioblastome multiforme GBM) est la forme de tumeurs cérébrales la plus courante et la plus agressive (60% de l'ensemble des cancers du cerveau[169]). Il présente encore aujourd'hui un très mauvais pronostic.

Différents types de tumeur du cerveau existent, elles sont classées suivant des paramètres histogénétiques. Le dernier classement de l'Organisme Mondial de la Santé datant de 2016 intègre également pour la première fois des paramètres moléculaires[170]. Le GBM appartient au terme plus général de gliome définissant les tumeurs touchant les cellules gliales. Ces dernières constituent l'environnement des neurones, longtemps considérées comme de simples cellules secondaires, elles sont maintenant reconnues comme essentielles pour la survie neuronale, la régulation de l'homéostasie cérébrale, l'établissement de la barrière hémato-encéphaliques et pour la surveillance immunitaire du cerveau[171]. Elles sont classées en quatre sous-types cellulaires. Le GBM est le nom utilisé pour définir les tumeurs de grade IV composées de cellules à l'aspect astrocytaire, sous type des cellules gliales qualifiées de neuroprotectrices fournissant de l'énergie et régulant les activités métaboliques des neurones[172] .

Suivant les cas, le GBM peut présenter différentes localisations[173], pour la majorité des patients il se situe dans la partie supérieure de l'encéphale. Les tumeurs peuvent également apparaitre au niveau du cervelet ou dans la moelle épinière dans de plus rares cas. Il peut atteindre des personnes de tout âge mais présente une prévalence pour les personnes de plus de 50 ans avec un âge médian de 64 ans lors du diagnostic[174, 175]. Les patients atteints de glioblastomes ont une survie médiane d'environ un an et un taux de survie à 5 ans après diagnostic de seulement 10 %[176]; c'est un cancer ayant l'un des pronostics les plus sombres, tout type de cancer confondu. Les causes restent largement inconnues. Actuellement l'exposition à une haute dose de radiation ionisante est le seul facteur de risque confirmé, les prédispositions génétiques n'ont été observées que dans 5-10% des cas[177, 178]. Certaines analyses suggèrent une augmentation de l'incidence des GBM (1% par an en moyenne ces dernières années) qui ne pourrait pas simplement s'expliquer par un vieillissement de la population mais aucun lien avec les changements de nos modes de vie n'a été établi[179]. De nombreuses suspicions ont été faites concernant l'utilisation des téléphones portables, les ondes non-ionisantes et l'apparition de cancers cérébraux et GBM[180–182] mais le lien n'a clairement pas été démontré et les études réalisées ne font pas consensus.

Les traitements utilisés actuellement sont multimodaux et agressifs. Ils combinent une résurrection tumorale par chirurgie et des protocoles de radio- et chimiothérapie mais ils permettent seulement de retarder la récidive constamment observée. De nombreuses nouvelles stratégies plus ciblées sont en cours d'exploration, inhibiteurs de facteurs de croissance, immunothérapies et vaccins antitumoraux, utilisation de nanoparticules pour le franchissement de la barrière hémato-encéphalique[183, 184]. Cependant, en dépit de la découverte de plusieurs cibles thérapeutiques qui s'annonçaient prometteuses, aucune ne s'est révélée efficace pour le moment[184]. La mise en place et le test de nouvelles thérapies est complexifiés par le nombre relativement faible de patients pouvant participer aux essais cliniques (le GBM est une maladie dite rare) associé à une importante disparité de la maladie. Les tumeurs GBM présentent une exceptionnelle hétérogénéité à l'échelle inter-tumorales et intra-tumorales au niveau phénotypique et moléculaire[185–188]. Les mutations s'accumulent également

au cours du temps ajoutant une évolution génétique temporelle[187, 189]. Ceci complique amplement l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques et rend quasiment inenvisageable la mise en place d'un traitement universel efficace.

Cellules souches de glioblastome (CSG)

Un nombre croissant de données suggèrent que ces tumeurs sont organisées de manière hiérarchique à la manière du tissu neural sain. Cette organisation est initiée et maintenue par une sous population de cellules souches cancéreuses nommées dans ce cas cellules souches de glioblastomes[190]. Leur existence peut expliquer les récidives constantes des GBM malgré l'utilisation de thérapies de plus en plus agressives. Dans ce contexte, de nombreuses analyses génomiques, transcriptomiques ou protéomiques ont tenté de caractériser cette sous-population de cellules du glioblastome par des marqueurs membranaires (CD133[191, 192] , L1CAM , CD44[193–195]) ou intracellulaire (olig2[196], Oct4, sox2…). Néanmoins, aucun consensus pour l'identification des CSGs à l'aide de tels marqueurs n'a pu être établi[197] et la combinaison de plusieurs marqueurs semble indispensable[64]. Leur rareté, la diversité de leurs origines (lignée cellulaire, biopsie, xénogreffes[195]) et l'absence de mise en culture standardisée pourraient expliquer les contradictions observées entre les études. Les cellules du GBM se définissent par une extrême hétérogénéité et instabilité génomique[198] et des études montrent l'existence de divers clônes et plusieurs types de CSGs au sein d'une même tumeur[56, 187, 200]. De plus, le maintien de leurs propriétés souches est directement influencé par leur microenvironnement[194] et les CSG sont caractérisées par une importante plasticité et une grande dynamique. Le pH[200], la présence de cellules du microenvironnement[201] et l'interaction avec les cellules immunitaires[202] ont déjà été reconnus comme ayant un rôle dans la maintenance des CSGs. Elles sont aptes à réduire leur métabolisme et à se mettre en quiescence, ce qui leur permet de résister aux protocoles de chimiothérapie[190]. Elles semblent également capables de dé-différenciation : quatre facteurs transcriptionnels ont été identifiés comme capable de dé-différentier des cellules en CSG[203]. Le pH pourrait également posséder un rôle dans ce phénomène, une augmentation de marqueurs souches a été retrouvée dans un environnement plus acide[204].

Ces différents constats constituent aujourd'hui un frein important à leur caractérisation par l'intermédiaire de marqueurs « classiques » et rend le concept de l'existence des CSGs confus. Ceci reviendrait à un état cellulaire possible plutôt qu'à une véritable identité. Il semble alors particulièrement intéressant si ce n'est indispensable d'étudier de manière dynamique les CSGs mais aussi le rôle du microenvironnement tumoral sur leur comportement.

Cellules à l'origine des cellules souches de glioblastome :

Les cellules à l'origine des GBM est encore largement inconnu. Le GBM étant essentiellement composé de cellules au phénotype astrocytaire, la proposition d'astrocytes comme cellule à l'origine du GBM est évidemment attractive. Cependant, l'identification récente d'une sous-population de cellules

immatures de glioblastomes qui partage des caractéristiques avec les cellules souches neurales a évidemment mis à mal cette dernière hypothèse.

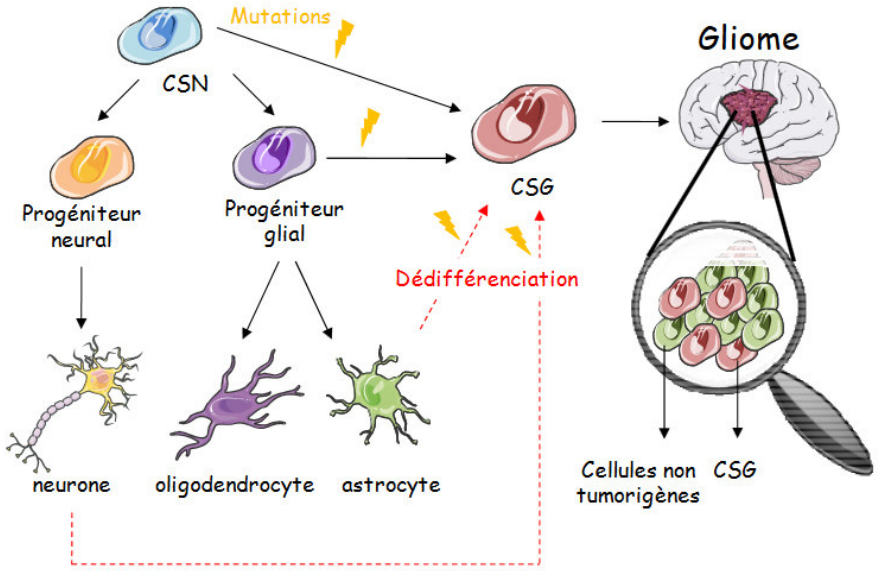


Figure 18 : Hypothèses sur l'origine des cellules de glioblastome. Les cellules souches de glioblastome pourraient résulter de l'accumulation de mutations (éclairs jaunes) entraînant la transformation oncogénétique d'une cellule souche neurale (CSN) ou d'un progéniteur glial ou par la dédifférenciation d'un astrocyte ou d'un neurone mature[205].

Deux propositions se dégagent donc : la cellule à l'origine est une cellule immature (cellules souches neurales ou progéniteurs)[206, 207] ou une cellule plus différentiée qui requiert alors une étape de dédifférenciation[208, 209]. Evidemment, les deux hypothèses ne sont pas incompatibles, l'importante hétérogénéité du GBM peut également être synonyme de différents types de cellules à l'origine[210].

Propriétés mécaniques des gliomes :

Au cœur d'un cerveau sain, il a déjà été montré qu'il existe une disparité des propriétés mécaniques, suivant les différentes aires cérébrales[211] mais aussi au cours du vieillissement. De plus en plus d'études démontrent l'importance des signaux mécaniques sur le fonctionnement des cellules neurales[212], la rigidité locale de l'environnement des neurones semble par exemple guider la trajectoire des axones par l'intermédiaire de canaux ioniques mécano sensibles comme Piezo1[213].

Les propriétés mécaniques du cerveau évoluent au cours du développement tumoral. A l'instar des leucémies et de la moelle osseuse confinée à l'intérieur de l'os, les cellules du cerveau sont contraintes par la boite crânienne, les forces de compression appliquées sur les différentes cellules doivent augmenter radicalement lors de la progression tumorale. Ces forces compriment le tissus sain, (elles sont par ailleurs souvent considérées comme responsables des symptômes neurologiques observés chez les patients[214]), mais sont également appliquées aux cellules tumorales. Le changement de composition de la matrice extracellulaire et sa rigidification mais également l'augmentation du réseau de vascularisation (les GBM sont généralement très vascularisés) vont aussi avoir des effets sur les changements physiques de l'environnement mécanique local des cellules. Comme pour la plupart des cancers, le module élastique semble plus important au sein du GBM en comparaison avec un tissu sain[215] mais semble varier avec les régions[216]. La rigidification du tissu pourrait également être un signe de mauvais pronostic et de haut grade de gliome[217, 218].

Des études *in vitro* montrent l'effet de la rigidité du substrat sur des cellules du GBM qui semblent impacter leur prolifération (par augmentation de l'expression et/ou phosphorylation du

récepteur EGPR)[219] et leur motilité[220, 221, 222]. La migration a déjà été identifiée comme potentiel facteur de pronostic[223]. Le degré de mécano-sensitivité des cellules semble dépendre des patients[224] mais aussi de la sous-population cellulaire[225, 226] . Outre la rigidité du substrat, peu d'études ont été mises en place pour comprendre le rôle des propriétés physiques du microenvironnement sur le comportement des cellules de GBM. Un système de compression cellulaire a permis de montrer que la compaction des cellules induit une surexpression de collagène, du facteur de croissance endothélial VEGF et de l'enzyme lysyl-oxidase responsable de la réticulation du collagène[227]. Ceci démontre un lien entre les forces mécaniques et l'augmentation de rigidité de la matrice extracellulaire mais aussi avec l'angiogenèse.

Le projet :

C'est dans ce cadre, qu'un projet collaboratif entre l'équipe du CRCL dirigée par le Dr Gabut et notre équipe (plus particulièrement Dr Monnier Sylvain, Dr Rivière Charlotte et Dr Delanoe-Ayari Hélène) a été initié au cours de ma thèse. Ce groupe travaille sur la compréhension des mécanismes post-transcriptionnels des cellules souches embryonnaires et dans le contexte des cellules souches de Glioblastome. L'idée de ce projet est donc de coupler les expertises de biologies cellulaire, moléculaire et transcriptomique de nos collaborateurs avec les connaissances et méthodes de microfluidique et de mécanique cellulaire développées au sein de l'équipe afin de :

1) Etudier le comportement et les propriétés de la sous-population de cellules de GBM dites souches de manière dynamique au sein de neurosphères (terme désignant les sphéroïdes multicellulaires dans le cadre de cellules neurales) en utilisant des approches biophysiques, microfluidiques et de vidéomicroscopie.

2) Etablir une signature moléculaire de sous-population de cellules identifiées en fonction de leurs propriétés fonctionnelles.

3) Mimer les différents niveaux de forces mécaniques rencontrées in vivo et comprendre leur effet sur les cellules du glioblastome.

Les cellules utilisées au cours de l'étude sont des cellules de GBM obtenues par dissociation de prélèvements tumoraux issus d'exérèses chirurgicales de patients. Dans ce manuscrit, les cellules étudiées sont les cellules N14 qui proviennent à l'origine de l'équipe "neuro-oncologie expérimentale" de l'institut du cerveau et de la moelle épinière du docteur Ahmed Idbaih. Elles ont ensuite été amplifiées *in vitro* dans l'équipe du docteur Gabut. Elles sont gardées en culture en 3D au sein de neurosphères dans un milieu de culture sans sérum et supplémenté par divers facteurs de croissance. L'utilisation de neurosphères est la méthode la plus largement utilisée pour la culture de population peu différenciée de cellules neurales ou de de glioblastome[228].

Afin de suivre le devenir et le comportement des CSGs, l'équipe du docteur Gabut a mis en place un système de rapporteur de l'activité du protéasome appelée ZsGreen. Le protéasome est un complexe enzymatique du cytosol. Sa fonction principale est la dégradation de protéines. Il présente un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires dont le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Plusieurs études ont montré que les cellules cancéreuses aux propriétés souches présentent une faible activité du protéasome : les protéines composant le protéasome sont sous-exprimées et leur inhibition forcée chimiquement semble n'avoir aucun effet contrairement à ce qui se passe pour d'autres cellules cancéreuses où une augmentation de la mortalité est visible[229, 230]. Un rapporteur de l'activité du protéasome est utilisé : il est nommé Zsgreen et résulte de la fusion d'un dégron (partie d'une protéine

régulatrice de sa dégradation) cible du protéasome avec une protéine fluorescente. Le complexe est cloné dans un système lentiviral qui permet la production de rétrovirus et l'infection de cellules N14. La protéine de fusion fluorescente s'accumule ensuite dans les cellules. L'activation potentielle du protéasome induit sa dégradation et donc la perte de la fluorescence. Les cellules Zsgreen positives seront donc fluorescentes, puisque le protéasome y est inactif et ne dégrade pas la protéine de fusion, alors qu'au contraire le signal est éliminé dans les cellules ZsGreen négative par action du protéasome.

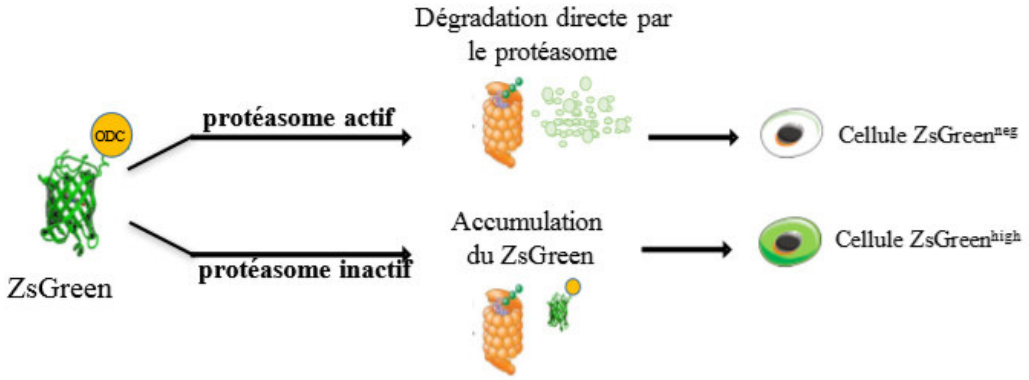


Figure 19 : Mécanisme de suivi de l'activité du protéasome par fusion d'une protéine fluorescente avec un dégron. Lorsque le protéasome est actif il dégrade la protéine alors que lorsque son activité est réduite ZsGreen s'accumule au sein de la cellule. Issu de[231].

3. L'hydrogel utilisé pour contrôler le microenvironnement des cellules dans cette thèse : l'agarose

3.1. Présentation générale

La très grande majorité des microsystèmes utilisés pour la culture cellulaire est réalisée avec un polymère nommé PDMS (Polydimethylsiloxane)[232]. C'est un matériau peu coûteux, transparent, considéré comme biocompatible, facile à mouler (ratios nanométriques des dimensions) et il peut être coller de manière étanche très facilement sur des substrats en verre par simple traitement plasma). Cependant il peut également présenter d'importantes limites pour la culture cellulaire à long terme ; il est notamment imperméable aux petites molécules solubles (résultant en un conditionnement rapide du milieu de culture cellulaire (baisse de nutriments et augmentation de la concentration des facteurs sécrétés) si un flux continu n'est pas apporté dans le dispositif. De plus, il présente une absorption des agents thérapeutiques rendant l'utilisation de drogues impossibles dans ce genre de système[234, 235]. Enfin, la rigidité de ce type de matériau est bien supérieure à celles rencontrées *in vivo* (Mpa vs kPa)[235]. Des microsystèmes en hydrogel ont commencé à voir le jour pour contourner ces limites mais sont encore largement minoritaires[236]. C'est ainsi qu'il a été décidé d'utiliser un hydrogel comme matériau principal des deux systèmes présentés en partie 3 et 4 de ce manuscrit et développés au sein de l'équipe biophysique.

Le choix s'est porté sur un hydrogel naturel présentant différents avantages. L'agarose est un polymère issu d'agar-agar purifié, il est naturel, non toxique et donc parfaitement biocompatible. La concentration et le type d'agarose de poids moléculaire différents (standard, low and ultra low gelling point) utilisé et les changements thermiques subis modulent ses propriétés physiques. La taille des pores de l'agarose varie de 80 nm à 500nm, permettant ainsi la diffusion de la plupart des molécules[237] La rigidité peut également être ajustée, elle est proche des rigidité rencontré *in vivo* et balaie les différences rencontrées entre les tissus[238]. La rigidité dépend de la concentration utilisée mais également là aussi des conditions thermiques qu'il a rencontré[238, 240, 241]. C'est un matériau largement utilisé dans l'ingénierie tissulaire [238] mais encore assez peu en microfluidique[241–243].

3.2. Caractérisation

Compte tenu des différences de rigidité pouvant être observées suivant la préparation du gel d'agarose, nous avons décidé de caractériser des échantillons de gel d'agarose préparé dans nos conditions d'expérimentation. Un essai de traction a tout d'abord été réalisé pour remonter au module de Young de nos gels. Pour cela, l'agarose est moulé à l'intérieur de tubes pasteurs en verre (Ø 5,5 mm), laissé gélifié selon nos conditions expérimentales puis démoulé et accroché à une potence puis soumis à un test de déformation longitudinale. Des masses sont suspendues à son extrémité par l'intermédiaire d'un crochet conçu en plastique et collé à la glue. L'élongation du cylindre est obtenue automatiquement par analyse d'images et par l'utilisation d'un algorithme de suivi implémenté sous Matlab présenté dans le chapitre 4. L'ajout des masses s'effectue par palier de 0,1g et atteint 0,6g au maximum.

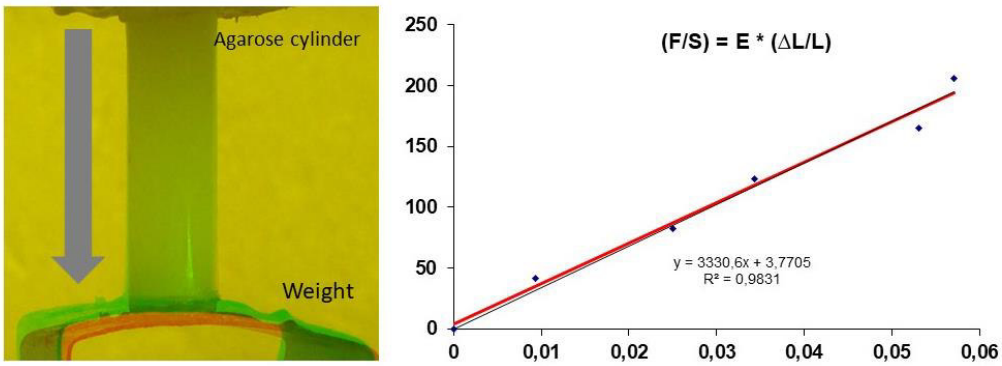


Figure 20 : Essai de Traction de cylindre d'agarose Ultra Low 2% m/v contenant des billes Ø400 nm. Des masses sont suspendues à son extrémité et la déformation du gel est détecté par analyse d'images. Deux images sont superposées en fausse couleur pour se rendre compte des déplacements et. A droite : exemple d'une mesure obtenue pour un test réalisé l'un des tests.

A partir de cette déformation nous remontons alors au module d'Young de notre gel. Le test est réalisé pour trois échantillons différents et nous donne pour des échantillons d'agarose Ultra-Low 2% m/v présentant des billes de Ø 400 nm une valeur de 3,3 +/- 0,2 kPa. Nous avons pu également appréhender le comportement élastique du gel sous ses faibles contraintes : le cylindre reprenant sa forme initiale après élimination des masses suspendues.

Bien que ces tests de traction nous aient finalement donné des résultats exploitables, la technique est assez laborieuse à mettre en place ; la déformation doit bien rester dans l'axe longitudinale et le collage doit être effectué proprement afin de ne pas fausser les mesures par d'éventuelles traces de colles sur le cylindre. La taille du cylindre est également une difficulté, des tests ont été effectués avec des cylindres plus long qui cassaient trop rapidement ou à l'inverse qui présentaient une hauteur réduite ; la déformation est alors difficile à observer dans nos conditions expérimentales.

Des analyses supplémentaires ont été effectuées au rhéomètre. Des échantillons d'agarose cylindriques sont cette fois-ci conçus par moulage dans des boites de pétri. Une lamelle est déposée sur le dessus pour s'assurer de la planéité de l'échantillon. Les propriétés mécaniques des échantillons sont

obtenues en utilisant une déformation imposée par un rhéomètre oscillatoire et à rotation Anton Paar MCR 301. Les mesures sont effectuées à température ambiante en utilisant une géométrie Plan-Plan.

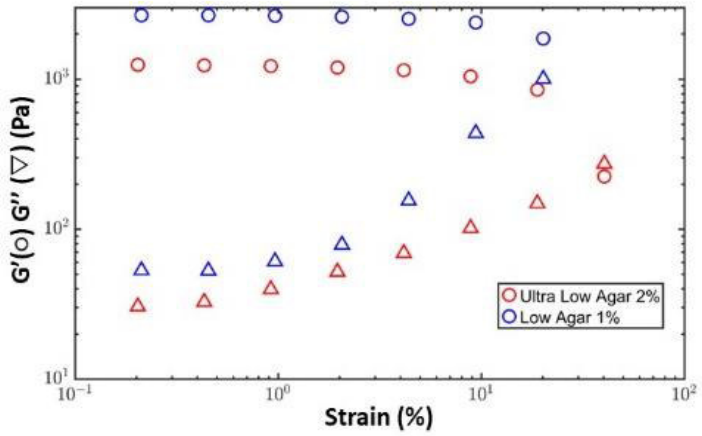


Figure 21 : Mesures rhéologiques du module élastique G' et du module de dissipation G'' d'un échantillon d'agarose Low melt 1% m/v et Ultra Low 2% m/v.

Les mesures rhéologiques ont été effectué pour au moins trois échantillons de chaque type d'agarose et ont montré une reproductibilité correcte des données. Un plateau est présent pour les petites déformations alors qu'un éventuel softening du matériau apparaît à plus forte contrainte. Une étude récente a notamment documenté ce phénomène[244] ; cependant, un éventuel glissement de l'échantillon qui pourrait aussi expliquer ce type de courbes n'est pas à exclure (même si une surface rugueuse (rugosité 40 µm) a été utilisée lors de la mesure pour réduire ce problème). Dans la zone du plateau, nous pouvons donc remonter à la valeur du module d'Young dans les deux cas. Les résultats obtenus pour l'agarose Low melt 1% a été intégré à l'article[245] associé avec des expériences mises en place par l'équipe MILE (Micro-Nanofluidics for Life science and Environment) du LAAS en collaboration avec l'équipe de Julie Guillermet-Guibert du Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse.

Dans les deux cas, l'agarose peut donc être considérée comme purement élastique pour un taux de déformation inférieur à 10%. Il peut donc être utilisé comme alternative au polyacrylamide pour la microscopie à force de traction, utilisé dans le chapitre 4. La valeur du module élastique peut être modulée en changeant le type et le pourcentage d'agarose

.

Chapitre 3 : Système de confinement en 2D

L'objet de ce chapitre 3 est le développement d'un système permettant d'appliquer des contraintes mécaniques en 2D sur une population de cellules. Dans un premier temps, les différents systèmes existants pour l'étude de la compression cellulaire en 2D seront présentés puis nous décrirons le cahier des charges que nous avons retenu pour notre système de confinement, les difficultés rencontrées et les différentes versions testées pour y répondre. La section deux sera ensuite réservée à la présentation de la version finale du système de confinement : sa mise en place et la description de ses différents éléments. Enfin, les différentes étapes de sa validation et les premiers résultats obtenus sur l'étude de la signalétique sous confinement seront présentés.

1. Présentation du système de confinement

1.1. Systèmes existants

L'intérêt pour l'étude du rôle des contraintes mécaniques sur le devenir des cellules est grandissant dans différents contextes, allant du développement à l'ingénierie des tissus jusqu'à la cancérologie. De multiples techniques ont donc déjà été développées afin de contraindre les cellules en 2D et étudier leur comportement. Cependant, il n'est pas aisé d'établir des méthodes pertinentes permettant une analyse précise du rôle des contraintes mécaniques à long terme, tout en préservant des conditions de culture physiologiques.

Divers outils, permettant le contrôle localisé des forces appliquées, ont été mises au point par les biophysiciens : microscopie à force atomique[246] , aspiration par micropipette[247, 248] pinces optiques[249, 250,] pinces magnétiques)[251] et microplaques[252, 253]. Ce sont des techniques précises mais bas débit et qui permettent seulement de regarder les réponses immédiates et individuelles des cellules.

Des systèmes microfluidiques ont également été développés, ils sont souvent plus faciles à mettre en place et permettent d'obtenir un débit d'exécution plus important. Des microcanaux[254, 255] le passage par des pores de taille définie[248] ou des piliers[256–259] ont été conçus afin d'induire des déformations cellulaires. Ils sont réalisés en polydimethylsiloxane (PDMS) matériau très largement utilisé en microfabrication dû à divers avantages. À ceux-ci, se sont également ajoutés des systèmes de « coussins » d'agarose, ils permettent quant à eux d'appliquer des contraintes fixes sur une population de cellules en contrôlant la force appliquée grâce à un piston ou à un poids.

Les systèmes de piliers et de coussin d'agarose présentent l'avantage de permettre d'appliquer une contrainte sur la totalité d'une population 2D de manière stable, ils pourraient donc être utilisés sur des longues durées. Divers systèmes ont déjà été développés et sont présents dans la littérature. Leurs caractéristiques techniques sont résumées dans le Tableau 1. Cependant, il ne semble qu'aucun d'eux ne réponde à tous les critères demandés par des analyses dynamiques à long terme. En effet, des limites sont tout d'abord souvent dues à l'utilisation fréquente du PDMS qui présente de nombreux avantages mais également des inconvénients dans le cas de systèmes biomimétiques. D'une part, il est imperméable aux petites molécules solubles ce qui peut mener à un conditionnement rapide du milieu

de culture (baisse de nutriments et augmentation des facteurs sécrétés) s'il n'y a qu'un faible volume de culture et pas de système de perfusion[260]. De plus, même si pour certains outils une injection est permise[257], les molécules hydrophobes s'absorbent massivement à sa surface, il est donc compliqué de l'utiliser en combinaison avec des molécules pharmaceutiques[234, 233]. Outre le matériau utilisé, d'autres éléments des systèmes peuvent poser des problèmes. Par exemple, la présence d'une lamelle de verre ou d'une pièce au-dessus peut compromettre les échanges gazeux et l'absence de réserve pour le milieu de culture compromet leur utilisation pour des analyses sur plus de deux jours [100,256,261,262]. Ces outils peuvent donc permettre d'étudier la réponse cellulaire seulement dans les premières heures tout au plus. Or, les contraintes mécaniques impliquées dans le contexte tumoral, peuvent être appliquées plusieurs jours si ce n'est plusieurs mois ; il est donc intéressant de voir les effets de celles-ci à plus long terme et de détecter si les cellules mettent en place une forme d'adaptation. A noter également que deux systèmes commerciaux sont maintenant également disponibles : Flexcell Fx-5000[263] et les différentes variations proposés par la société 4Dcells[264]. Les deux sont directement pensés pour une très bonne compatibilité avec les systèmes de microscopie classique et une facilité d'utilisation. Cependant, le premier est très coûteux et nécessite un contrôle par ordinateur ; le deuxième est une amélioration du système présenté en[260], il intègre en plus une possibilité de perfusion mais utilise toujours du PDMS.

Il n'existe donc pas de système idéal et il est difficile de composer avec toutes les contraintes imposées par la culture cellulaire. L'approche que nous avons choisie est d'appliquer une déformation uni axiale à une population de cellules en 2D par des piliers mais cette fois-ci conçu en agarose et avec un système de confinement permettant de garder les cellules dans de bonnes conditions de culture pendant plusieurs jours. Pour cela, nous lui avons imposé un certain nombre de contraintes présentées dans la partie suivante.

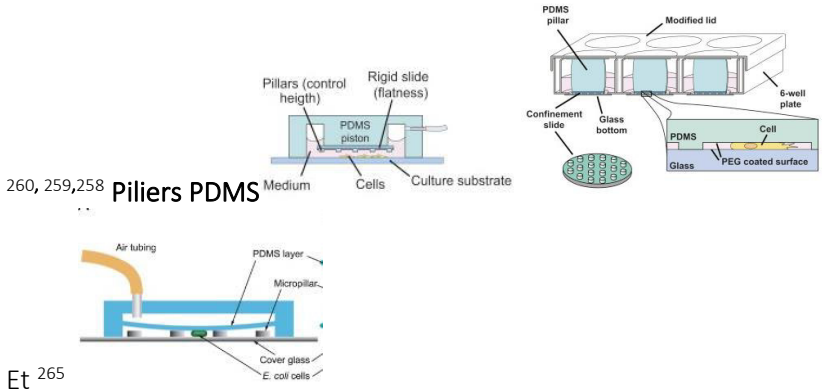
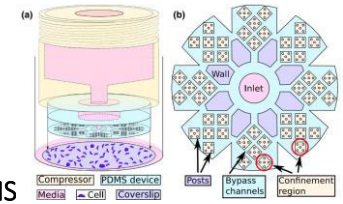
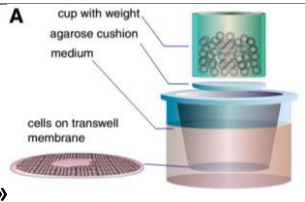
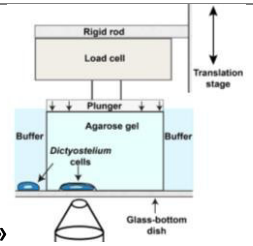
Système	Principales caractéristiques	Avantages/inconvénients
[260, 259,258] Piliers PDMS  Et [265]	Matériau : PDMS Substrat : lamelle de verre	- Version 6 puits - Compatibilité microscopie haute résolution - Désavantages liés à l'utilisation du PDMS - Pas d'accès au milieu de culture (renouvellement, ajout de drogues) - Présence d'une lamelle de verre au-dessus (échange gazeux ?)
[257] Piliers PDMS 	Matériau : PDMS Substrat : lamelle de verre	- Version 6 puits - Compatibilité microscopie haute résolution - Accès à la réserve du milieu de culture - Plateforme directement adaptée à l'imagerie - Désavantages liés à l'utilisation du PDMS
[266,256,97,262,267] « agarose cushion » 	Matériau : agarose Substrat : lamelle de verre, membrane	- Compatibilité microscopie haute résolution - Pas d'accès au milieu de culture (renouvellement, ajout de drogues) - Présence d'une lamelle de verre au-dessus (impact échange gazeux ?)
[268, 269]« Cell squasher » 	Matériau : agarose Substrat : lamelle de verre	- Compatibilité microscopie haute résolution - Contrôle précis et dynamique du - Rattachement obligatoire à un microscope et système motorisé de chargement - Une condition à la fois - Obstruction de la lumière transmise

Tableau 1 : Différents systèmes de confinement cellulaire en 2D. Des systèmes de piliers de hauteurs contrôlées en PDMS permettent d'aplliquer des déformations aux cellules alors que des systèmes de coussin d'agarose permettent de travailler à contraintes fixes.

1.2. Contraintes et cahier des charges :

Nous avons donc décidé de développer un nouvel outil de confinement cellulaire tout en se rapprochant au plus près des conditions retrouvées *in vivo* afin d'étudier l'impact de contraintes mécaniques prolongées. Le principe retenu est celui utilisé à plusieurs reprises en PDMS ; l'idée est d'imposer une déformation à une population de cellules ensemencées sur un support en 2D en appliquant un réseau de piliers de hauteur contrôlée Figure 22.

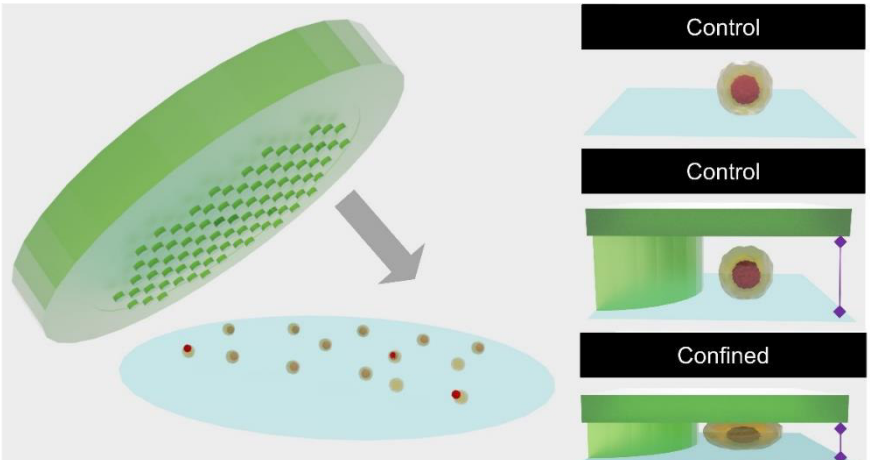


Figure 22 : Principe du système de confinement cellulaire. La hauteur des piliers permet de moduler les contraintes appliquées sur les cellules.

Le système doit donc être compatible avec les conditions expérimentales nécessaires à la culture cellulaire sur plusieurs jours. Les matériaux utilisés doivent être biocompatibles, stérilisables et stables dans les conditions d'expérimentation (37°C, 100% d'humidité). De plus, le confinement est amené à être appliqué plusieurs dizaines d'heures ; il est alors indispensable d'avoir une circulation des gaz mais aussi un renouvellement efficace du milieu de culture. Il doit disposer d'une réserve de milieu de culture accessible, permettant de pouvoir remplacer le milieu mais également de pouvoir ajouter des réactifs ou drogues.

D'autres contraintes sont liées aux techniques de visualisation et d'analyses. Nous voulons avoir la possibilité de visualiser les cellules par microscopie classique, le chemin lumineux ne doit donc pas être obstrué mais aussi permettre l'utilisation de microscopie haute résolution et objectifs à faible distance de travail. Ensuite, des analyses moléculaires classiques (PCR, Western Blot…) très largement utilisées par nos collaborateurs doivent pouvoir être réalisées post-confinement, ce qui nécessite de pouvoir récupérer *in fine* la population cellulaire soumise au confinement.

Enfin, des propriétés sont ajoutées concernant sa mise en place. Il doit être simple d'utilisation, facilement transférable chez nos collaborateurs biologistes (ne pas nécessiter d'instruments techniques trop spécifiques et non facilement accessibles pour un laboratoire de biologie), duplicable et reproductible afin de pouvoir tester différentes conditions en parallèle et coupler les analyses d'effet du confinement avec l'ajout de drogues par exemple.

Il a donc fallu composer avec ces multiples éléments afin d'imaginer notre système de confinement cellulaire.

1.3. Difficultés et différentes versions :

En raison de ses différentes propriétés intéressantes présentées dans la partie précédente, l'agarose a été choisie pour la réalisation du réseau de pilier nécessaire au confinement. Il présente une rigidité faible, le gel est alors assez facilement déformable et difficile à manipuler manuellement. Une première pièce est donc nécessaire afin de mouler le gel mais doit également être conservée dans le système de confinement pour servir de support ; ceci n'était pas nécessaire dans les systèmes de confinement présentés dans la section précédente utilisant du PDMS beaucoup plus rigide et maniable. Un système de serrage va ensuite permettre de placer et maintenir le support et le gel contenu dans celui-ci, parfaitement en contact avec un substrat, sur lequel seront ensemencées les cellules. Nous avons choisi d'utiliser des lamelles de verre. Contrairement au polystyrène des boîtes de culture ou à la lame de verre plus épaisse, elles permettent une visualisation par microscopie haute résolution. Ce choix peut cependant compliquer la mise en place du système, une lamelle pouvant facilement casser ou flamber.

Différents prototypes ont été nécessaires avant l'élaboration d'une version répondant entièrement au cahier des charges présentées en 1.2, ils sont visualisables en Figure 23 et brièvement présentés dans cette partie. Cette phase de développement a été beaucoup plus longue qu'initialement prévue dans le projet de thèse, avec le temps nécessaire à l'imagination des designs, les délais de fabrication ou de modifications et les différentes phases de tests.



Figure 23 : Premières versions du système de confinement. Version 1 : Système combinant deux joints en PDMS et une fermeture par un bouchon de tube Falcon. Version 2 : Le serrage est assuré par deux pièces en Voltaef. Version 3 : Système principalement conçu par impression 3D, une rondelle de serrage est ajoutée pour plaquer plus spécifiquement le gel.

Version 1 :

Le premier système imaginé était composé d'un tube Falcon de 50ml à bouchon clipsable sectionné à une hauteur de 1.2 mm, positionné sur une grande lamelle de verre (51 x 76 mm) et de deux éléments en PDMS, le premier rigide (10:1) formant un socle et assurant le maintien du support et du gel et un second plus mou (~50:1), légèrement plus haut que la hauteur du tube, constituant un joint d'appui. Ce dernier se positionnait au-dessus du support du gel et, après fermeture du tube Falcon, appliquait une légère pression et permettait de plaquer le support et le gel contre la lamelle. Un joint siliconé était ensuite positionné tout autour du tube afin d'assurer l'étanchéité de l'ensemble. Cette version du système était le résultat du travail de R. Zagala et S. Sacci, stagiaires dans l'équipe avant mon arrivée. Quelques essais d'amélioration ont été effectués mais malgré mes efforts, les manipulations se sont malheureusement révélées très peu reproductibles ; une légère différence de hauteur ou de

rigidité des joints empêchait un serrage correct du système et la force de fermeture par le couvercle du tube Falcon était très peu contrôlable. La lamelle de verre, libre, pouvait facilement flamber ou casser.

Version 2 :

Une seconde version a donc été imaginée afin d'accroître la reproductibilité. Elle a été conçue à l'aide de G. Suteau du service technique de l'ILM. L'idée était alors d'avoir des pièces réutilisables, un serrage par vis plus facilement maîtrisable et un encastrement de la lamelle pour éviter les problèmes cités plus haut. Il se composait de deux pièces en Voltaef, c'est un matériau coûteux mais qui présente des propriétés très intéressantes comme sa transparence, sa stabilité en température sur une large plage, sa résistance aux rayonnements UV et son inertie chimique. La première pièce permettait un encastrement de la lamelle et la deuxième venait serrer le support et le gel contre la lamelle en vissant les deux parties l'une contre l'autre. Malgré quelques modifications du système (dimensionnement, ajout de vis supplémentaires), cette solution était insuffisante pour l'obtention d'un serrage adéquat et homogène du gel contre la lamelle. De plus, l'encastrement de la lamelle à l'intérieur de la pièce inférieure semblait être une mauvaise option au vu des légères différences d'épaisseur observées dans un même lot de lamelles.

Version 3 :

Un nouvel outil a ensuite été étudié avec G. Simon (ingénieur d'étude de l'ILM) afin de produire un serrage plus localisé au niveau du support du gel en agarose. Deux pièces majeures permettaient de maintenir la lamelle et le support du gel en place en x,y et une rondelle de serrage était ajoutée pour venir serrer plus spécifiquement le support. Afin de gagner du temps dans la conception et en réduire le coût, ce système a été principalement fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D utilisée par le personnel du département mécanique de l'ILM. L'homogénéité et la reproductibilité du confinement du gel contre la lamelle était amplement amélioré. Malheureusement, lors de nos premiers tests sur plusieurs jours à l'incubateur, il s'est avéré que nous avions une déformation légère avec le temps, à 37°C à 100% humidité due au manque de rigidité et à la porosité du matériau. Ceci modifiait donc la hauteur imposée pour la compression au cours du temps. Différentes solutions ont alors été testées pour contrer ce problème (renforcement de l'épaisseur de la pièce inférieure, élaboration de cette même pièce en aluminium) cependant aucune ne s'est révélée suffisante.

Version 4 :

Il a alors été décidé d'externaliser l'élaboration de systèmes de serrage, basés sur le même design mais en acier inoxydable de grade médical. Ce changement nous a permis de résoudre les problèmes de stabilité. La solution finale retenue est présentée plus en détails dans la partie suivante et a été fabriquée en petite série afin de pouvoir tester plusieurs conditions en parallèle.

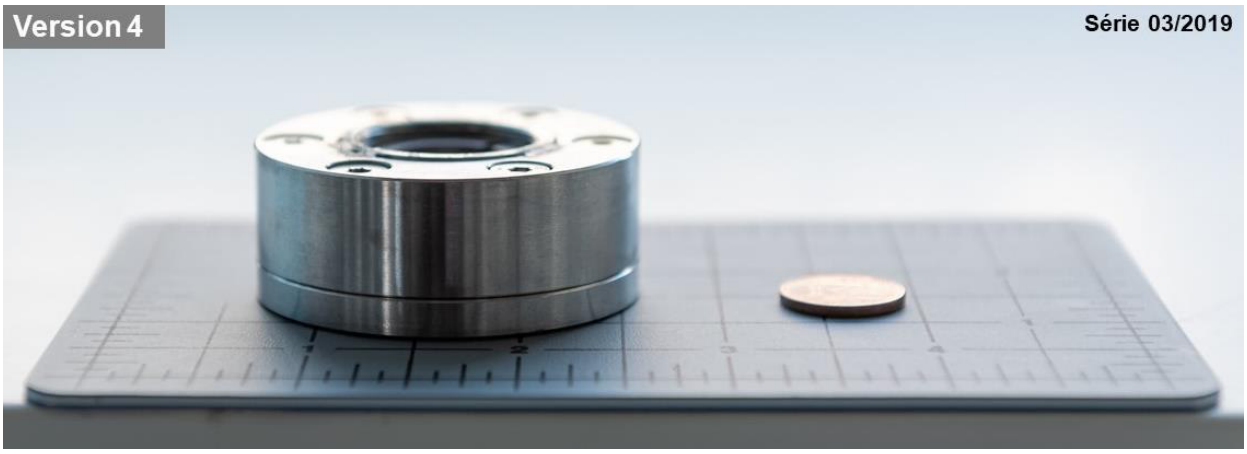


Figure 24 : Version finale du système de compression. Les pièces sont réalisées en Polycarbonate et acier inoxydable.

2. Version finale du système de confinement

Le système final se compose de deux parties majeures : le gel en agarose présentant les piliers et le système de serrage permettant de maintenir ce dernier parfaitement en contact avec les cellules et de maintenir leur confinement. Une première figure présente les différentes étapes de montage du système, visualisable également sur le film accessible ici. Les différents éléments et leur conception sont présentés plus en détails dans la partie suivante.

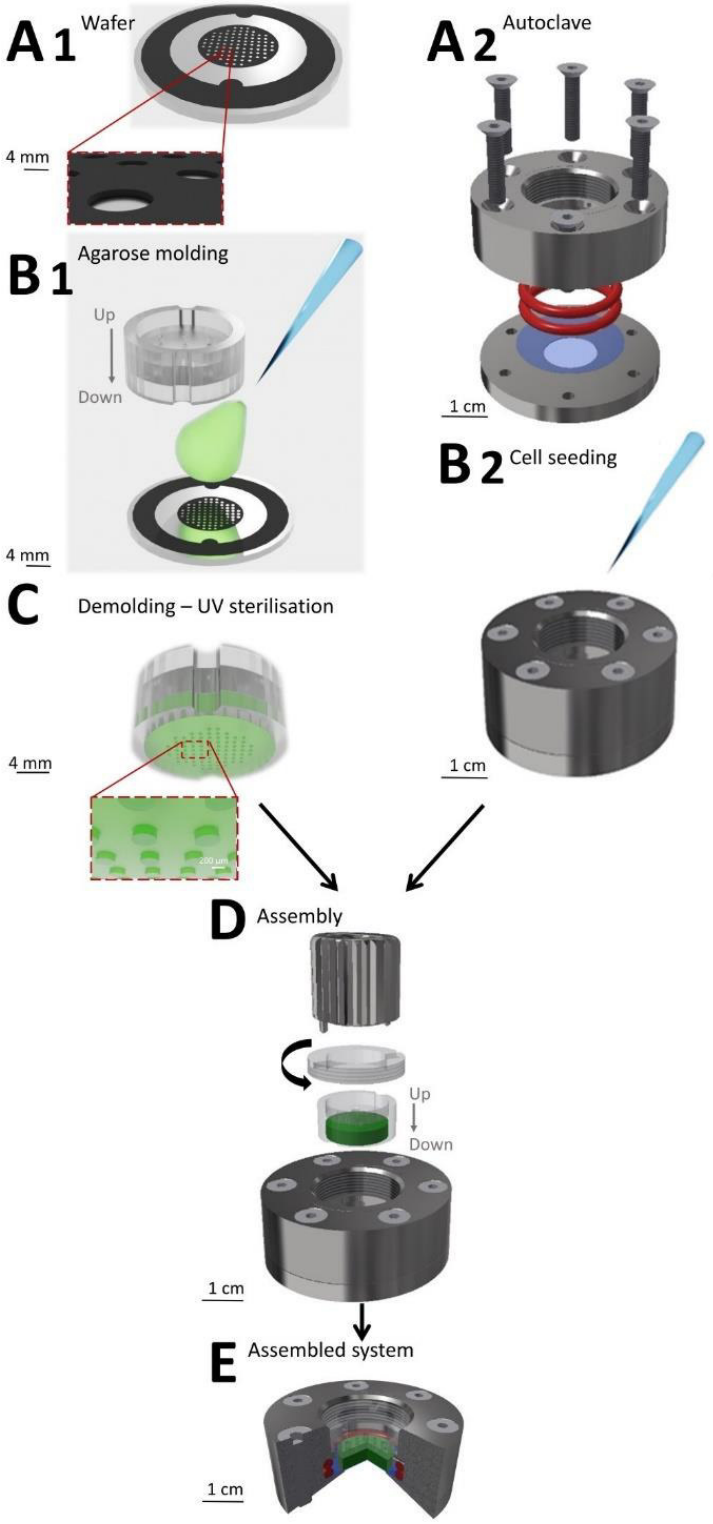


Figure 25 : Préparation et assemblage du système de confinement cellulaire.

Les étapes (A1-B1 et A2 B2) sont effectuées en parallèle.

(A1) Wafer utilisé pour le moulage de l'agarose. (B1) Moulage de l'agarose sur le wafer de silicium à l'aide du support en PC. (A2) Assemblage du système avant autoclavage : deux pièces en acier inoxydable supportant une lamelle de verre (en bleu) et deux joints en silicones (en rouge). (B2) Ensemencement des cellules sur la lamelle de verre présente dans le système. (C) Représentation du gel en agarose présentant les piliers, stérilisé par traitement UV avant l'assemblage. (D) Assemblage du système : Le support en PC contenant le gel d'agarose (en vert) est placé au-dessus des cellules ensemencées sur la lamelle de verre à l'aide d'une rondelle de serrage et d'un outil de serrage spécifique. (E) Coupe du système assemblé (en bleu : la lamelle de verre, en rouge : les joints en silicone, le gel d'agarose présentant le réseau de piliers).

La dénomination des différentes pièces est donnée sur la Figure 26.

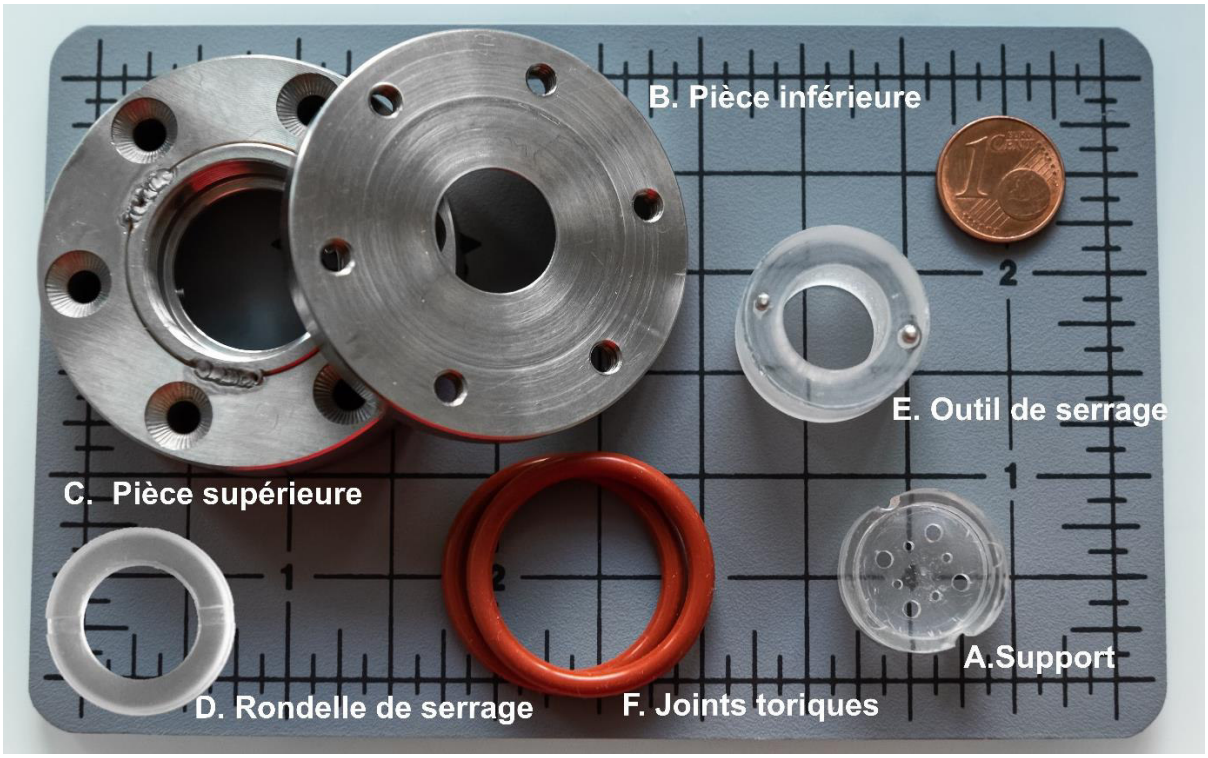


Figure 26 : Photos des différents éléments constituants le système de confinement et leur dénomination. Les systèmes de serrage se composent de deux parties en inox permettant de maintenir une lamelle de verre (B et C). Deux joints en silicone (F) permettent d'assurer l'étanchéité. Le support en Polycarbonate (A) maintient le gel en agarose. Il est plaqué sur la lamelle de verre à l'intérieur du système par une rondelle de serrage (D) à l'aide d'un outil de serrage spécifique (E).

2.1. Le gel d'agarose :

Le premier élément du système est donc le gel en agarose présentant le réseau de piliers à hauteur contrôlée. Il est créé à partir de wafers en silicium dont la fabrication repose sur les techniques classiques de photolithographie. Ce dernier peut être réutilisé plusieurs fois sans détérioration. Le type de résine, les paramètres de l'étape de centrifugation le temps et température de recuit et la quantité d'UV permettent de moduler l'épaisseur de notre résine (fixant la hauteur des piliers après moulage de l'agarose). Le design utilisé dans notre cas est le suivant : des piliers répartis de façon équidistante entourés d'une couronne. Les piliers ont un diamètre de 440 µm, sont espacés de 3,2 mm et couvrent l'ensemble de l'agarose afin d'assurer l'homogénéité du confinement. Le bord est renforcé par une bordure de 2 mm permettant de stabiliser la structure.

Les gels en agarose sont donc moulés à partir des wafers de silicium ainsi créés et de supports en polycarbonate Figure 26, pièce A représentée sur la Figure 27. Ces pièces sont composées de deux sections : la partie interne servant d'empreinte à l'agarose et la partie supérieure qui va servir à contenir la réserve de milieu de culture. Neuf trous permettent la connexion entre les deux et constituent ainsi les entrées/sorties du système. Des repères externes permettent, grâce à leur homologue sur le wafer, un alignement correct et reproductible du motif. Leur conception en polycarbonate permet d'avoir un matériau transparent et résistant aux rayonnements UV (utilisés pour la stérilisation). Il est relativement peu coûteux, présente une bonne résistance aux chocs et aux rayures mais aussi aux différences de

température (jusqu'à 120°C) ; ils pourraient donc également être autoclavés. Dans un premier temps, ils ont été conçus en plexiglas cependant ce dernier était relativement fragile et ne supportait pas les cycles répétés de stérilisations pas rayons UV, le polycarbonate (plus résistant) a été préféré à celui-ci dans la version finale du système.

L'agarose est moulée directement dans le support en polycarbonate à partir des wafers en silicium. Une fois gélifié, les entrées/sorties sont percées dans les gels au travers de trous présents sur les supports à l'aide de punchers. Le support contenant le gel en agarose est enfin placé dans du PBS stérile et stérilisé par traitement UV. Il est ensuite incubé à 37°C dans du milieu de culture.

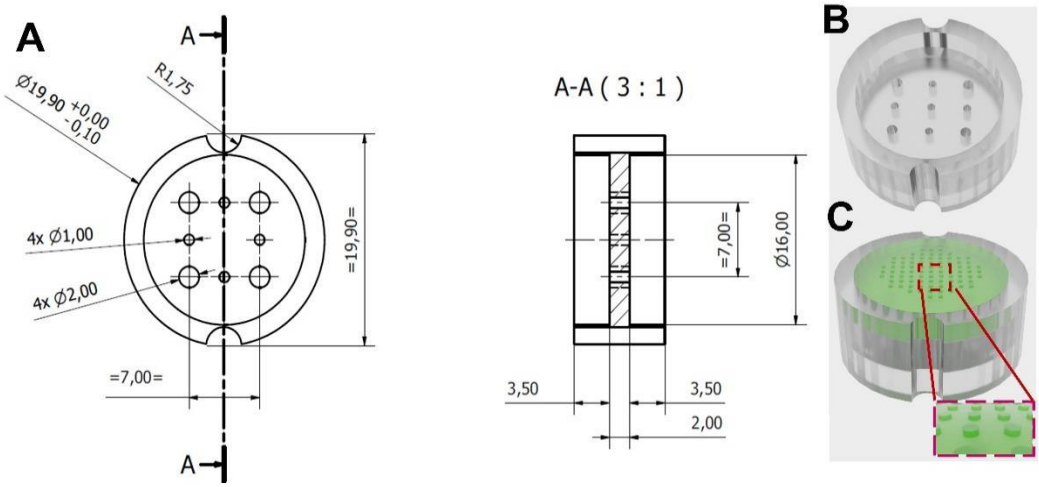


Figure 27: Support pièce A et gel d'agarose. La partie inférieure permet de contenir le gel en agarose alors que celle du dessus constituera la réserve de milieu de culture. Des trous permettent la liaison entre les deux et des encoches extérieures permettent d'une part un bon positionnement lors du moulage et d'autre part de le maintenir en position en x,y lors du serrage.

2.2. Le système de serrage :

Un système de serrage va ensuite permettre de placer le support en polycarbonate et donc le gel présentant les piliers contenus dans celui-ci, parfaitement en contact avec une lamelle de verre. Il est composé de deux parties en acier inoxydable qui supportent et maintiennent une lamelle en verre où seront ensemencées les cellules. Une rondelle de serrage permet ensuite de venir plaquer et maintenir le support et le gel en agarose parfaitement en contact avec la lamelle et donc aussi avec les cellules.

La pièce inférieure du système Figure 26, pièce B présente une ouverture au centre de 15 mm de diamètre et une forme incurvée comme représentée sur la Figure 28, ce qui permet de venir placer un objectif au plus près de la lamelle de verre pour la visualisation des cellules dans le système.

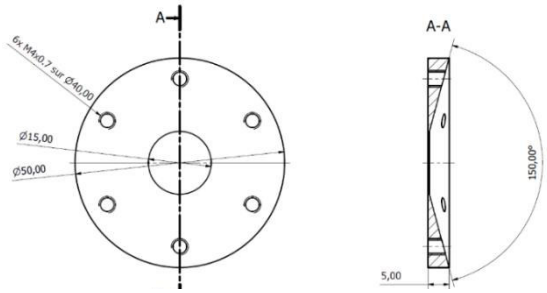


Figure 28 : Dessin technique de la partie inférieure du système de confinement Pièce B. Une ouverture est laissée pour visualisation par microscopie.

La partie supérieure Figure 26, pièce C a, quant à elle, une ouverture centrale constituant l'emplacement du support en PC. Deux encoches internes permettent de maintenir le support en PC en x,y grâce aux deux repères externes visualisables sur la Figure 28 qui servaient déjà à l'alignement du support lors du moulage d'agarose. Un insert permet de visser une rondelle de serrage Figure 5, pièce D qui va venir plaquer le support et le gel d'agarose contre la lamelle de verre. La rondelle est conçue en forme d'anneau pour un libre accès à la réserve de milieu de culture. Deux encoches permettent de la visser à l'aide d'un outil de serrage spécifique Figure 26, pièce E.

Enfin, un autre aspect important du système est l'étanchéité. Différentes méthodes ont été testées : la première solution retenue a été de mouler des socles en PDMS (10 :1) et de les coller sur des lamelles de verre à l'aide d'une colle en silicone homologué FDA (Down Corning, 734) mais ceci s'est révélé chronophage. La seconde option a donc été d'utiliser deux joints toriques commerciaux. Des premiers tests ont été réalisés avec des joints en nitrile mais ces derniers se sont révélés très toxiques pour les cellules qui mourraient après quelques heures de contact. Ils ont été remplacés par des joints en silicone Figure 26, pièces F conçus pour le contact alimentaire (FDA). Ils supportent de larges plages de température, sont autoclavables et présentent une assez bonne résistance aux solutions chimiques agressives. Cette dernière version a été validée en mars 2019. Une 1ère série d'expériences ont ensuite pu être réalisées pour montrer l'intérêt de ce système pour analyser la réponse dynamique des cellules aux contraintes mécaniques.

3. Validation du système de confinement :

Après l'obtention de la dernière version du système de confinement, un certain nombre d'étapes de validation ont été nécessaires afin de s'assurer que le cahier des charges de départ était entièrement respecté. Dans la partie qui suit, le réseau de piliers est toujours réalisé à l'aide d'agarose standard à 4% (m/v). L'évaluation des différents aspects repose sur une même méthodologie commune à cette partie : deux conditions contrôles sont comparées à un état confiné Figure 31A, B et C:

- Le premier contrôle consiste simplement à ensemencer les cellules sur lamelle de verre, il est désigné par le terme « contrôle ».

- Le deuxième, de son côté, permet d'évaluer le comportement du système de confinement en lui-même en comparaison avec le premier contrôle sans agarose. Des gels présentant une hauteur de piliers de 30 µm sont utilisés, leur taille est supérieure à la hauteur de tous les types cellulaires utilisés. Ils n'induisent donc aucune déformation. Il est simplement noté « 30 µm ».

- L'état confiné « 5 µm » est obtenu par des piliers de hauteurs 5 µm : leur taille est inférieure à chaque type cellulaire étudié ici.

Trois types cellulaires différents sont employés : des cellules hématopoïétiques immatures TF1-GFP, leucémiques TF1-BA, des cellules stromales HS27A et des cellules épithéliales mammaires MCF10A.

3.1. Homogénéité et reproductibilité du confinement :

Le premier élément à vérifier est l'obtention d'un confinement cellulaire contrôlé, stable et uniforme sur toute la lamelle. Pour cela, des gels sont réalisés en ajoutant des billes fluorescentes lors de la préparation de l'hydrogel et des cellules fluorescentes (TF1-GFP) sont ensemencées dans les systèmes. Après montage, la hauteur des piliers est évaluée en réalisant des z-stacks du système par microscopie confocale. Nous nous assurons alors que les piliers en agarose sont bien parfaitement en contact avec la lamelle de verre en visualisant la fin du signal des billes fluorescentes au même niveau en z que la lamelle de verre et que les cellules adhérentes sur cette dernière. Cette vérification est effectuée pour différentes positions aléatoires, sur plusieurs systèmes et à différents temps (J0, J1 et J2). La distance entre la fin du gel et le bas des cellules est ensuite quantifiée par analyse d'images.

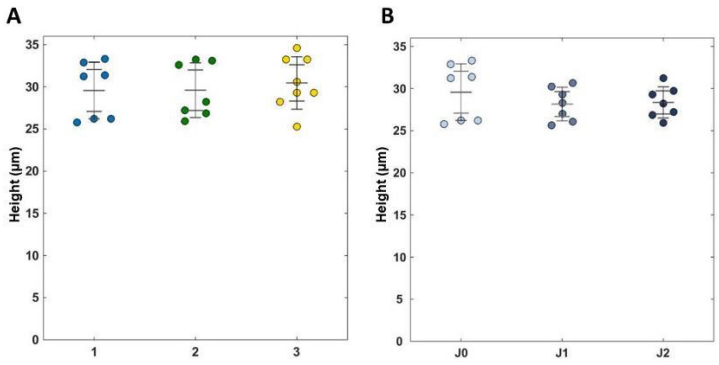


Figure 29 : Quantification de la hauteur des piliers d'agarose. (A) Evaluation de la reproductibilité : hauteurs pour trois systèmes différents, n=7 pour chacun. (B) Evaluation de la stabilité : hauteurs jour 0, jour 1 et jour 2 du même système gardé en culture n=7.

Elle reste stable et l'homogénéité inter et intra – système est correcte (l'incertitude de la mesure est estimée à +/- 2 µm). Ces deux éléments nous permettent de valider l'homogénéité, la reproductibilité et la stabilité du confinement des cellules à la hauteur souhaitée par le système développé. La section optique des images acquises pour ce test étant de 2 µm, la quantification n'a été réalisée que pour des piliers de 30 µm et non à 5 µm

En parallèle, nous avons évalué le phénotype des cellules TF1-GFP ensemencées dans le système, 24 h après confinement. L'aire des cellules est évaluée pour quatre positions différentes choisies aléatoirement sur la lamelle dans chaque cas.

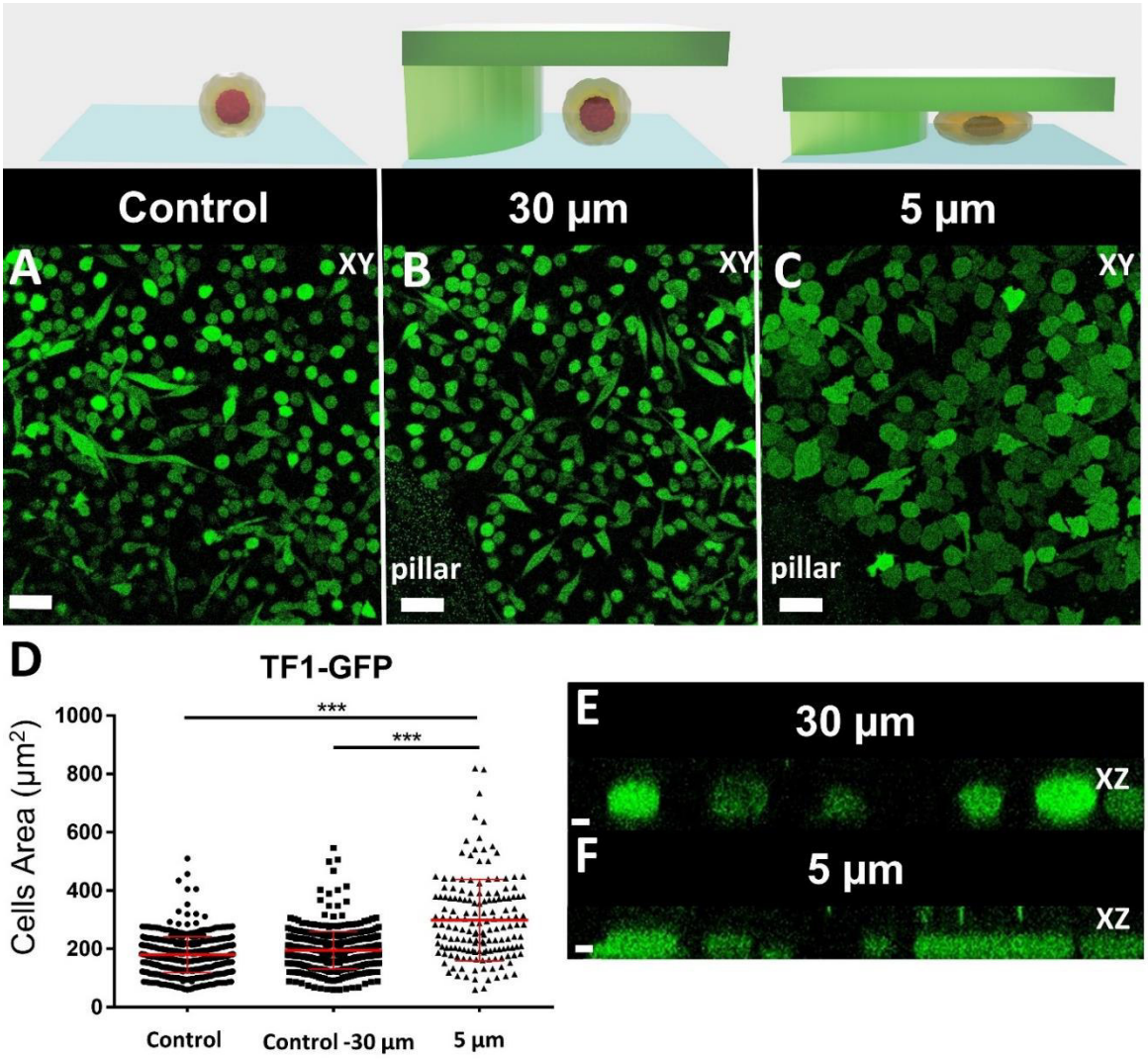


Figure 30 : Quantification de la morphologie cellulaire avec et sans confinement.

(A-C) : Morphologie des cellules immatures hématopoïétiques TF1-GFP pour le control sans gel (A) et pour des piliers de hauteurs 30 µm (contrôle) et 5 µm (confiné) (B et C) respectivement. Echelle = 20 µm. (D) Quantification de l'aire projetée par analyse d'images. L'aire projetée est similaire pour le contrôle et le 30 µm alors qu'il est significativement augmenté pour 5 µm. (t-test non appareillé, n>160 pour chaque condition. (E-F) section en z des cellules non confinées (E) et confinées (F) échelle = 10 µm. Microscopie confocale 20x.

Alors que les cellules de nos deux contrôles montrent une morphologie similaire, l'aire projetée des cellules confinées à 5 µm est signifiquement augmentée après 24 h (196 ± 3 µm² et 300 ± 11 µm²) Figure 30D. Comme voulu, les cellules présentent une forme sphérique et la hauteur des cellules n'est pas modifiée à 30 µm Figure 30E. À 5 µm, les cellules sont contraintes à la hauteur des piliers, leur hauteur est modifiée et présentent une forme plutôt cylindrique avec des bords arrondis Figure 30F.

3.2. Viabilité cellulaire :

Les cellules sont amenées à être gardées plusieurs jours dans le système. Il est donc indispensable de vérifier que l'utilisation du système n'a aucun impact sur la viabilité cellulaire à ces temps longs. Des tests préliminaires ont été effectués avec les cellules TF1-GFP, au bout de 48 h, les cellules ont été récoltées dans les trois conditions et la viabilité a été évaluée par bleu de Trypan et comptage à la cellule de Malassez. Ils ont montré une viabilité proche de 100% dans chaque cas et aucune différence entre notre premier contrôle sans agarose et le deuxième avec un gel et des piliers de 30 µm. Nous voulions ensuite confronter nos systèmes à des expériences sur du plus long terme. Pour cela, nous avons utilisé les cellules adhérentes mammaires MCF10A. Ces dernières présentent une inhibition de contact de prolifération et peuvent donc être conservées en culture à haute densité plusieurs jours. Elles sont laissées 7 jours au sein des systèmes avec un changement du milieu tous les trois jours. La viabilité des cellules est contrôlée après démontage des systèmes à l'aide d'un marquage classique de Live/Dead : les cellules vivantes sont marquées par la calcéine en vert alors que l'iodure de propidium marque l'ADN des cellules mortes en rouge. Des marquages après 1 jour et après 7 jours dans le système sont comparés sur la figure ci-dessous.

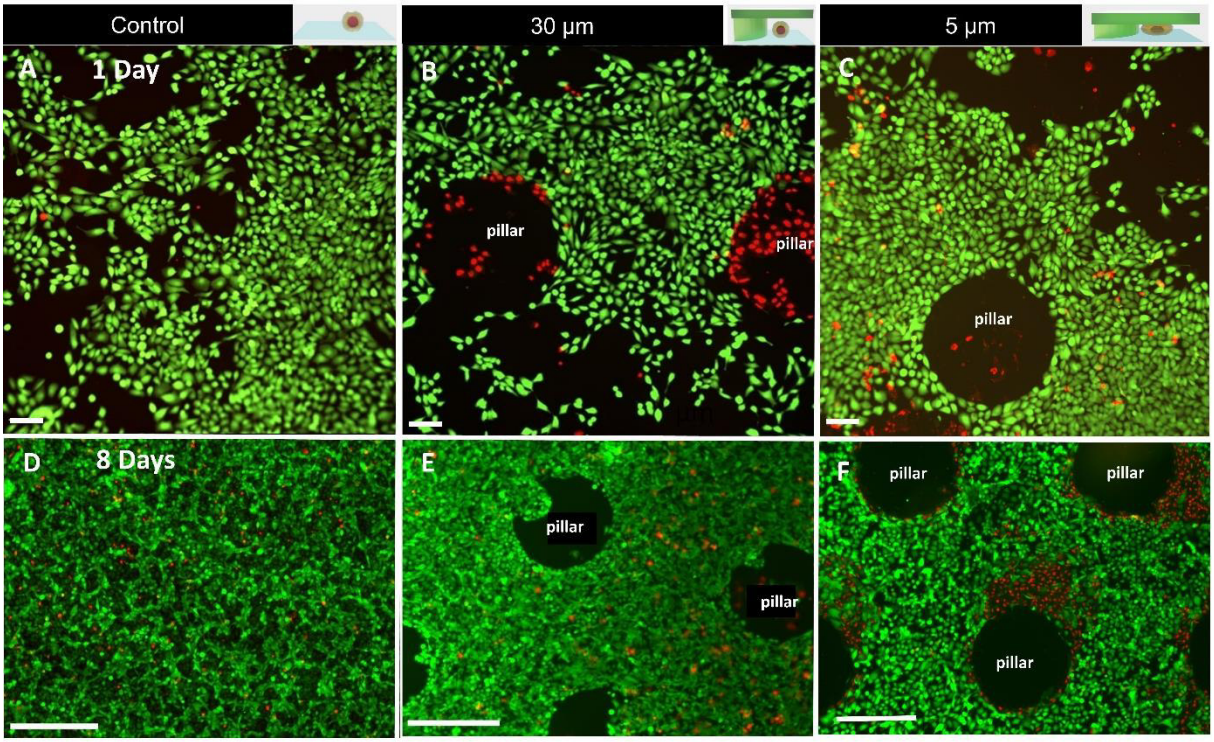


Figure 31 : Test de viabilité cellulaire des cellules MCF10A. Marquage des cellules vivantes avec la calcéine en vert des cellules mortes avec l'IP en rouge, (A, B, C) après 1 jour bar= 100 µm (D, E,F) après 8 jours Echelle= 400 µm Epifluoresecence 20x 1 jour, 10x 8 jours.

Aucune différence de viabilité n'est observée entre nos deux contrôles ni après un jour Figure 31A, B, ni après 8 jours Figure 31C, D de culture : la très grande majorité des cellules est vivante dans les deux cas, à l'exception des cellules écrasées sous les piliers. Le système en lui-même n'induit donc, même pour des expériences à très long terme, aucune mortalité cellulaire.

3.3. Vidéo-microscopie et suivi de prolifération :

Afin de continuer à évaluer le comportement des cellules au sein de notre système de confinement, nous avons ensuite étudié la prolifération cellulaire. Le système a été utilisé sur trois lignées cellulaires différentes : des cellules épithéliales mammaires adhérentes MCF10A, des cellules mésenchymateuses adhérentes HS27A et des cellules hématopoïétiques leucémiques non adhérentes TF1-BA. Des marquages Live du noyau des cellules ont été testés (Hoechst, Nuc live) pour établir un comptage automatique très facile à mettre en place. Aucune des options testées ne s'est avérée efficace : le marquage ne perdurait pas dans le temps imparti ou était nocif après quelques heures. Nous avons donc décidé de n'effectuer aucun marquage, même si l'étape de comptage a alors été assez manuelle et chronophage. Pour dix positions de chaque système, des images sont prises en contraste de phase. A chaque type cellulaire, le ratio de prolifération a été quantifié pour trois conditions : notre premier contrôle sans agarose, le deuxième avec des piliers à 30 µm (non confiné) et pour des piliers de 5 µm (qui correspond à un état confiné pour tous les types cellulaires analysés). Ceci a été reproduit pour trois expériences indépendantes au minimum.

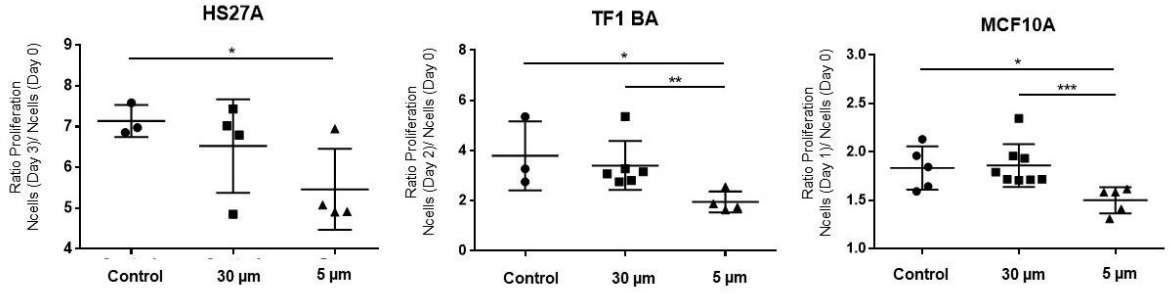


Figure 32 : Ratio de prolifération pour le contrôle sans agarose, piliers de 30 µm et de 5 µm. (A) HS27A durant 3 jours (B) TF1-BA durant deux jours (C) MCF10A durant 1 jour. La densité a été analysée pour 10 positions pour chaque système et mesurée pour au moins 3 expériences indépendantes.

Aucune différence significative n'est retrouvée entre les deux contrôles pour les trois lignées testées après 1 jour, 2 jours ou 3jours d'expérience ; la culture des cellules au sein du système n'a pas d'impact sur le taux de prolifération cellulaire. Le temps est choisi suivant les concentrations cellulaires acceptées par chaque type cellulaire. Une baisse est en revanche visible entre 30 µm et 5 µm, elle est significative pour deux types cellulaires (Figure 32B TF1-BA ratio de 1,9 +/- 0.2 pour 5 µm contre 3,40 +/- 0,4 pour 30 µm et MCF10A : 1,5 +/- 0.1 pour un état confiné à 5 µm contre 1,9 +/- 0.1 pour des piliers de 30 µm).

En parallèle de ces quantifications de prolifération, des timelapses ont été réalisés pour les TF1-BA et les MCF10A sur 24 h en lumière blanche. Ils mettent en opposition un état confiné à 5 µm et un état non confiné à 30 µm. La taille des systèmes permet, une fois montés, d'avoir deux systèmes côte à côte sur une plaque de dimension classique de culture cellulaire ce qui permet d'avoir un suivi simultané des deux conditions sous timelapse. Un exemple pour les cellules TF1-BA est visualisable ici et pour les MCF10A ici.

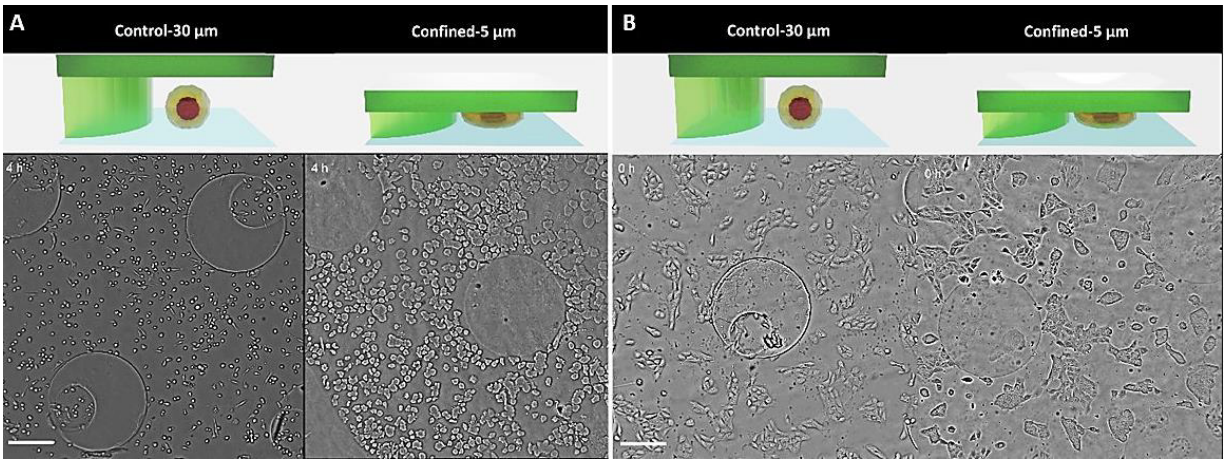
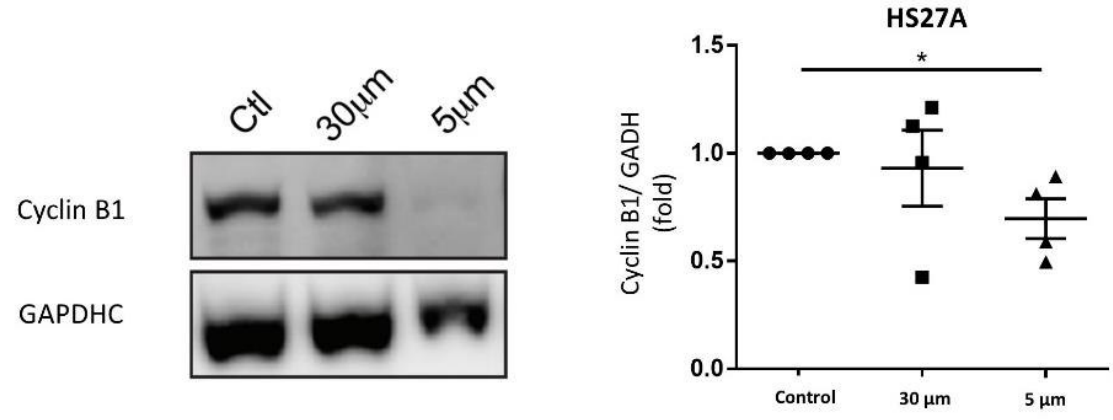


Figure 33 : Snapshot de timelapses (A) Cellules TF1-BA AVEC et sans confinement (B) MCF10A. Images obtenues en contraste de phase 10x échelle=200 µm.

3.4. Analyses moléculaires

Alternativement, nous avons voulu confronter notre système de confinement à d'autres types d'analyses avec des outils de biologie moléculaire classique comme le western-blot et la RT-qPCR. Le système est très facilement démontable, la population cellulaire peut donc être facilement collectée après confinement.

Des cellules HS27A sont récoltées après trois jours de culture et une analyse protéomique de la cycline B1 est effectuée par western blot. Cette dernière est un composant essentiel dans le contrôle de la mitose et une hausse est attendue lors de la progression entre la phase G2 et M du cycle cellulaire. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées et une nouvelle fois, nos trois conditions sont testées en parallèle.



.

Figure 34 : Western blot montrant le niveau de la protéine Cyclin B1 des cellules HS27A après 3 jours de culture. (A) Exemple d'un gel obtenu (B) Niveau de cyclin B1 (GADPH utilisé comme contrôle interne) n=4 pour chaque condition.

Des analyses moléculaires sont donc réalisables, le matériel biologique récolté est suffisant pour mettre en place des techniques classiques comme le Western blot. Ici, le niveau de la protéine cycline B1 est similaire pour le contrôle sans agarose et pour 30 µm, confirmant que le système de confinement

en lui-même n'a pas d'impact sur la prolifération des cellules. Une baisse est en revanche retrouvée à 5 µm, ce qui confirme une baisse de la prolifération de cette lignée cellulaire sous confinement.

3.5. Immunofluorescence :

Les tests précédents n'ayant décelé aucune différence entre notre contrôle sans gel d'agarose et notre contrôle à 30 µm, un seul des deux est désormais utilisé.

Marquage de la prolifération cellulaire

Afin d'analyser l'effet du confinement sur la prolifération, nous avons utilisé un marquage par le click-it EdU™. L'EdU est un indicateur de cellules proliféatrices : c'est un nucléoside comparable à la thymide qui est incorporé à l'ADN durant sa synthèse. Nous l'utilisons alors pour comparer le taux de prolifération des cellules MCF10A à 30 µm et confinées à 5 µm. L'EdU est ajouté directement dans la réserve de milieu de culture du système 1 h après son assemblage dans les deux conditions et est révélé le lendemain : ceci permet alors de détecter l'ADN synthétisé depuis 24 h. Le marquage est révélé après démontage des systèmes et fixation des cellules. Un marquage des noyaux sans distinction de prolifération (NucGreen) nous permet d'avoir un contrôle sur le nombre de noyaux présents sur la lamelle et d'accéder au ratio de cellules proliférative.

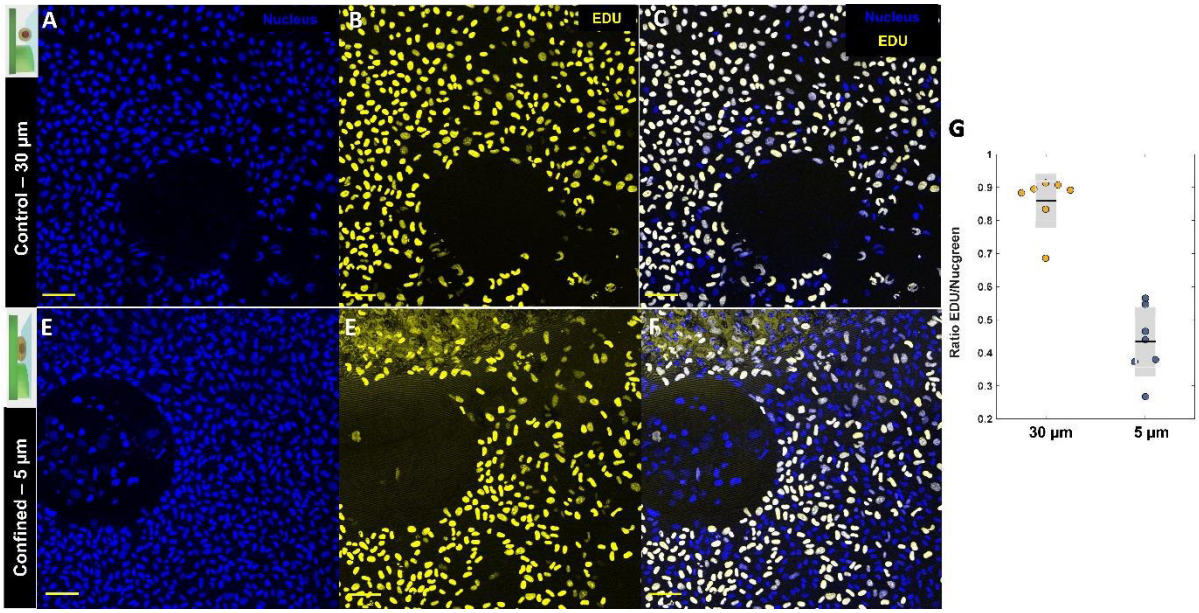


Figure 35 : Quantification des cellules MCF10A proliférative après 24 H dans le système. (A) (B) (C) avec des piliers de 30 µm (D) (E) (F) pour un confinement à 5 µm. (A), (D) Ensemble des noyaux marqués avec Nucgreen (B), (E) Cellules proliférative marquées par EdU. (C), (F) Fusion des deux marquages : les noyaux cellules proliférative dans les 24 H apparaissent en blanc alors que les autres apparaissent en bleu. Echelle des images 50 µm microscopie confocale 20x (G) Ratio des cellules marquées EdU / nombre de cellules, un point correspond à une position du système, N=1. Echelle = 100 µm

Le ratio de cellules marquées positivement à l'EdU par rapport au nombre de noyaux total, est supérieur pour des piliers de 30 µm par rapport à un état confiné à 5 µm. Après 24 h, 88+/-4 % des cellules se sont divisées à 30 µm alors qu'il y en a seulement 43 % +/-6 à 5 µm.

Morphologie cellulaire et immunofluorescence *in situ* :

Des tests d'immunomarquage ont ensuite été réalisés sur les cellules hématopoïétiques non adhérentes TF1-BA. Dans notre cas, même si nous forçons les cellules hématopoïétiques TF1 à adhérer sur une couche de fibronectine quelques heures avant le montage ; elles ne sont que faiblement attachées au substrat et tendent à devenir de moins en moins adhérentes avec le temps. Lors de nos premiers tests de marquage après démontage du système, nous perdions la quasi-totalité des cellules à la suite des nombreuses étapes de rinçage nécessaire à l'immunomarquage. De plus, l'induction de la production de l'oncoprotéine BcR-Abl réduit encore l'adhésion des cellules au substrat, la perte des cellules était donc exacerbée pour les cellules TF1-BA. Nous avons donc ensuite réalisé le marquage directement dans le système, les solutions sont ajoutées dans la réserve du système et les molécules diffusent ensuite à travers l'agarose. Après 48 h dans le système, les noyaux des cellules TF1-BA sont marqués en vert (Nucgreen) et l'actine en rouge (Phalloïdine). Pour la condition contrôle, impossible donc d'utiliser nos contrôles habituels sans gel d'agarose, nous utilisons donc un contrôle *in situ* des cellules non confinées. En effet comme présenté en 2.1, des trous sont percés dans le gel d'agarose, les cellules qui restent à cet endroit ne sont donc pas confinées mais restent immobilisées lors des étapes de marquage.

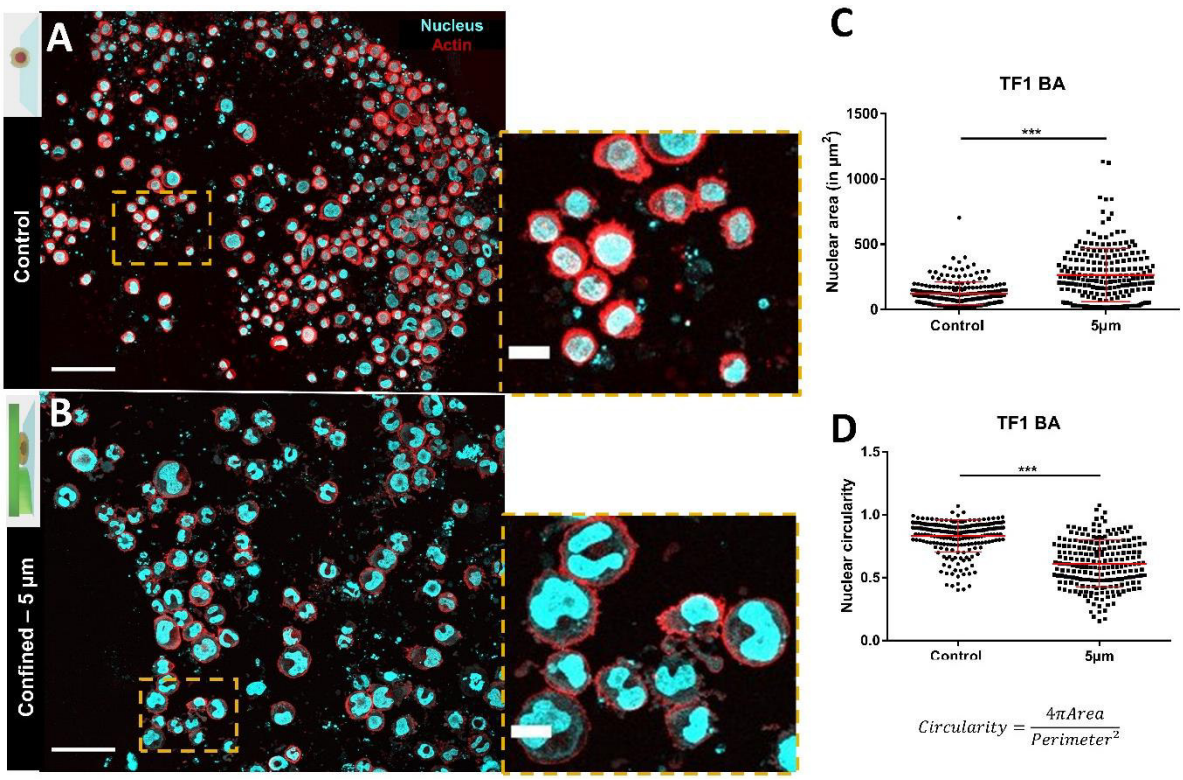


Figure 36 : Immunomarquage in situ de cellules non adhérentes TF1-BA, marquage après 1 jour dans le système des noyaux en vert (Nucgreen) et de l'actine en rouge (phalloidine). (A) Cellules contrôles (B) Cellules sous confinement à 5 µm. Zoom échelle = 20 µm microscopie confocal 20x (C-D) Quantification de la circularité et de l'aire des noyaux : les cellules confinées présentent un noyau dont l'aire et la déformation sont plus importantes comparées à la condition contrôle. 213 noyaux sont analysés au minimum pour chaque condition. Echelle de gauche = 50 µm à droite = 20 µm.

Nous comparons alors le phénotype nucléaire des deux conditions : l'aire nucléaire projetée est significativement supérieure lorsque les cellules sont confinées (Figure 36C, 122 ± 6 µm² pour le contrôle contre 265 ± 14 µm² pour les cellules confinées) mais également un noyau plus déformé, présentant une forme non circulaire (Figure 36D, baisse de la circularité des noyaux de 0,83 ± 0,01 à 0,61 ± 0,01).

3.6. Drug screening :

Un autre avantage de l'utilisation de piliers d'agarose pour le système de confinement est que contrairement au PDMS, il n'induit pas une absorption de molécules à sa surface. Les études de confinement cellulaire peuvent donc être combinées à l'ajout de drogues. Ici, nous testons son utilisation en combinaison avec une molécule pharmaceutique : l'imatinib. Son action est présentée dans le chapitre2, elle est utilisée comme thérapie ciblée pour les patients atteints de leucémie myéloïde chronique et a donc une action sur les cellules leucémiques que nous utilisons qui présentent l'oncogène Bcr-Abl : les TF1-BA. L'imatinib est ajouté après confinement des cellules à 2 µM et pendant trois jours. En parallèle, des systèmes sont laissés sans traitement et la même chose est effectuée dans des puits contrôles à l'intérieur de plaques de culture cellulaire classique. Comme pour le suivi de prolifération de 3.3, un comptage est effectué par analyse d'images avec un marquage d'Iodure Propidium marquant les cellules mortes. Ce processus ne peut pas être appliqué dans le cas des puits classiques, les cellules se regroupent en ilots sous traitement et il n'est pas possible de les individualiser pour le comptage. Un comptage à J3 est effectué en récupérant toute la population et en comptant par cellule de Malassez et marquage des cellules mortes par bleu de Trypan. Il est alors compliqué de comparer directement les valeurs obtenues dans les puits et dans le système (il faut prendre en compte les éventuelles pertes de cellules lors de la collection par le bleu Trypan, et nous n'avons pas la même erreur sur les mesures entre le comptage à la cellule de Malassez et le comptage des cellules in-situ). Cependant, la comparaison avec et sans traitement montre bien que les cellules sont largement affectées par la présence d'Imatinib même au sein du système. Le rapport de comparaison avec et sans traitement est comparable entre les puits contrôles et les systèmes à 30 µm. En revanche, Il n'est pas possible, pour l'instant, de présenter l'effet du confinement sur ces analyses ; l'expérience n'a été effectuée qu'une seule fois, la densité cellulaire était trop hétérogène au sein de la lamelle (ce qui est souvent le cas avec ce type cellulaire), ceci nécessiterait un nombre plus important de répliquas.

Un exemple d'images typiques et les valeurs de comptage sont donnés en annexe.

3.7. Ajustement de la rigidité :

Comme présenté en Chapitre 2, Il est facile d'ajuster la rigidité de l'agarose en changeant le type et la concentration utilisés. Dans le cas du système de confinement cellulaire, si la rigidité est abaissée les cellules peuvent alors déformer l'hydrogel utilisé pour la réalisation des piliers. Un confinement par un gel d'agarose Ultra low gelling point 2,0% (m/v) a été imposé sur des cellules TF1-BA pendant 3 jours. Un marquage des noyaux et de l'actine a été réalisé et les résultats sont présentés sur la figure suivante. La morphologie nucléaire est comparée avec une condition confinée avec de l'agarose standard et sans confinement.

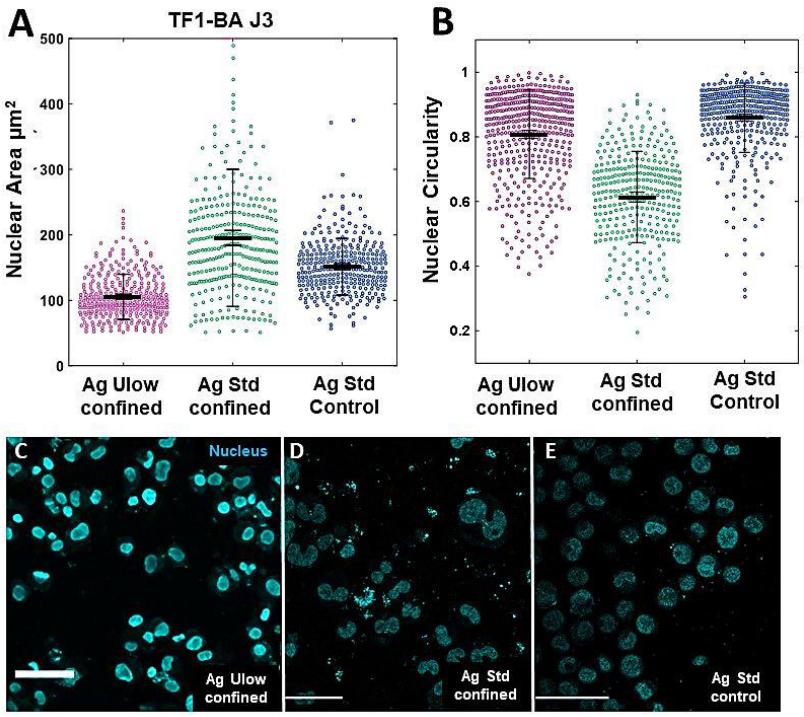


Figure 37 : Morphologie nucléaire des cellules TF1-BA après 72 h de confinement sous confinement avec Agarose Ultra low gelling point (Ulow) 2% (m/v), Agarose standard (std) et sans confinement. N>150 dans chaque condition.

(A) Aire nucléaire (B) Circularité nucléaire (C), (D), (E) Marquage nucléaire sous confinement agarose Ultra low gelling point, Standard et contrôle respectivement. Echelle = 50 µm. Circularité=4*π*Aire/Périmètre²

Sous agarose Ultra low gelling point, les noyaux présentent une aire et une circularité différentes des cellules sous confinement avec un gel en agarose standard et contrôle. Les valeurs obtenues sont de 105 µm² +/- 34 pour l'aire et 0,80 +/- 0,14 pour la circularité concernant le confinement en Agarose Ultra low gelling point contre 195 µm² +/- 105 et 0,63 +/- 0,3 pour l'agarose standard confiné et 154 µm² +/- 53 et 0,93 +/- 1,5 pour la condition contrôle.

4. Mécanique et signalisation

Le système en lui-même n'induit donc aucune différence de viabilité ni de prolifération pour les différents types cellulaires utilisés, il peut donc être utilisé pour étudier de manière efficace l'impact du confinement sur le comportement des cellules et ceci même pour des expériences à long terme. Cette partie présente les prémices des résultats obtenus à l'aide du système sur différents aspects des projets présentés dans le chapitre 2 tout d'abord concernant le modèle hématopoïétique et ensuite le modèle mammaire.

4.1. Mécano transduction chez les cellules hématopoïétique (TF1-GFP) : 1-Analyse globale de la population

La première stratégie adoptée a été d'effectuer des analyses d'expression génétiques par RT-qPCR sur des populations de cellules hématopoïétiques immatures TF1-GFP. Trois séries de tests n'ont montré aucune différence d'expression entre les gels de 30 µm et 5 µm, après 72 h, pour différents gènes pourtant rapportés comme mécano sensibles tel que Jun et Fos. Cependant, différents problèmes sont apparus et compromettent l'interprétation de ces résultats. Comme auparavant exposé, les cellules TF1-GFP sont des cellules non adhérentes qui sont forcées à adhérer sur un coating de fibronectine au départ de l'expérience ; cependant au bout de 72 h, beaucoup de cellules ne sont plus adhérentes sur la lamelle. Ceci démontre tout d'abord l'existence de deux populations différentes au sein de nos échantillons : les cellules restées adhérentes sur la lamelle et les cellules flottantes. Ces deux groupes peuvent alors posséder des propriétés bien différentes. Les analyses suivantes ont donc été réalisées à 48 h en séparant la portion des cellules qui sont restées adhérentes de celles flottantes. La figure suivante montre les résultats obtenus pour Fos et Jun.

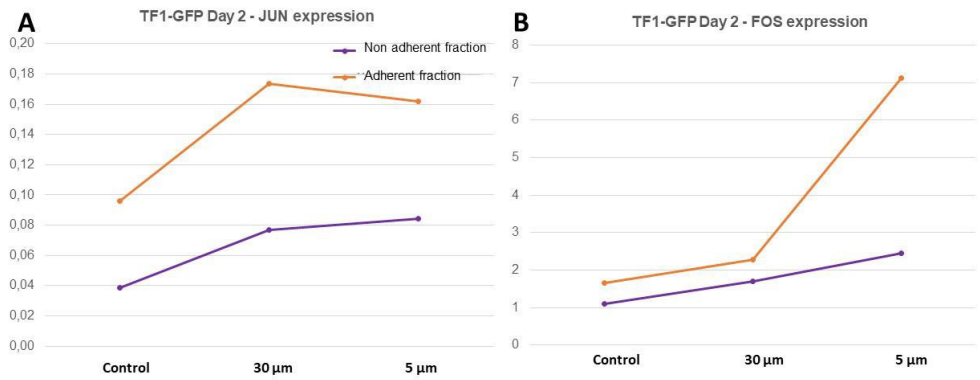


Figure 38 : Résultats RT-qPCR de cellules TF1-GFP après 48 h dans le système, en séparant les cellules adhérentes des cellules non adhérentes. (A) Expression de JUN (B) Expression de FOS, n=1.

L'expression est donc bien différente suivant les deux proportions, confortant l'idée qu'il semble important de les séparer pour des études génomiques. Cependant, les résultats demeurent difficiles à interpréter. Même si un nombre plus important d'expériences sont nécessaires pour ce type d'analyse, nous avons décidé de ne pas continuer dans ce sens. En effet, des problèmes d'hétérogénéité de population demeurent. Ces cellules ont fortement tendance à se regrouper, au cours du temps, contre les bords. Dans notre cas, à 72 h, nous avons donc très peu de cellules au centre de nos puits et un regroupement s'observe contre la couronne du gel en agarose Figure 39 A,B. Par microscopie confocale, nous pouvons voir que dans le cas des piliers de 30 µm, des cellules non adhérentes viennent parfois

constituer une deuxième couche de cellules au-dessus des cellules adhérentes en bord de puits Figure 39C. Ces cellules peuvent donc venir compromettre nos résultats.

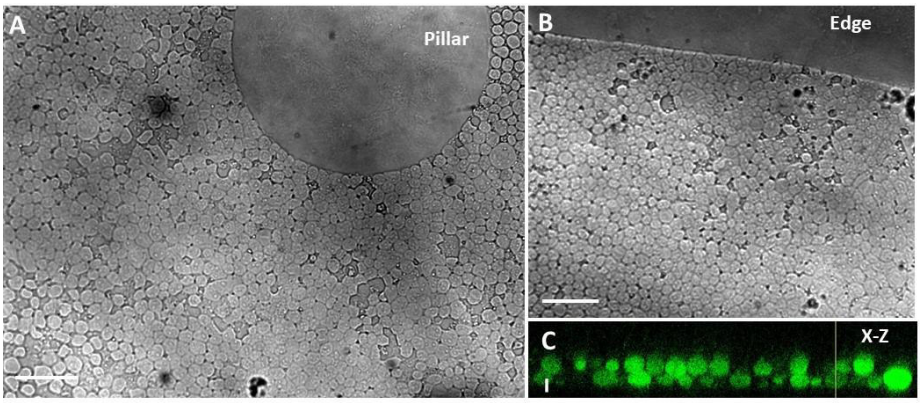


Figure 39 : Visualisation des bords des puits à 30 µm à 72 h pour les TF1-GFP (A) (B) contraste de phase échelle 50 µm (C) échelle = 10 µm microcopie confocale 20x dry.

4.2. Mécano transduction chez les cellules hématopoïétiques (TF1-BA) : 2- Analyse *in situ* par immunomarquage.

Des tests d'immunomarquage ont ensuite été effectués sur des cellules TF1-BA. Ici, contrairement à la RT-qPCR, une analyse locale est possible, nous pouvons sélectionner les zones que nous voulons analyser et évaluer si des différences sont observées entre différentes zones hétérogènes en densité cellulaire. Un immunomarquage *in situ* est effectué sur des cellules TF1-BA après 72 h : deux facteurs de transcription twist1 (magenta) et YAP (Yes asssociated Protein) ajouté à un marquage des noyaux (Nucgreen, cyan).

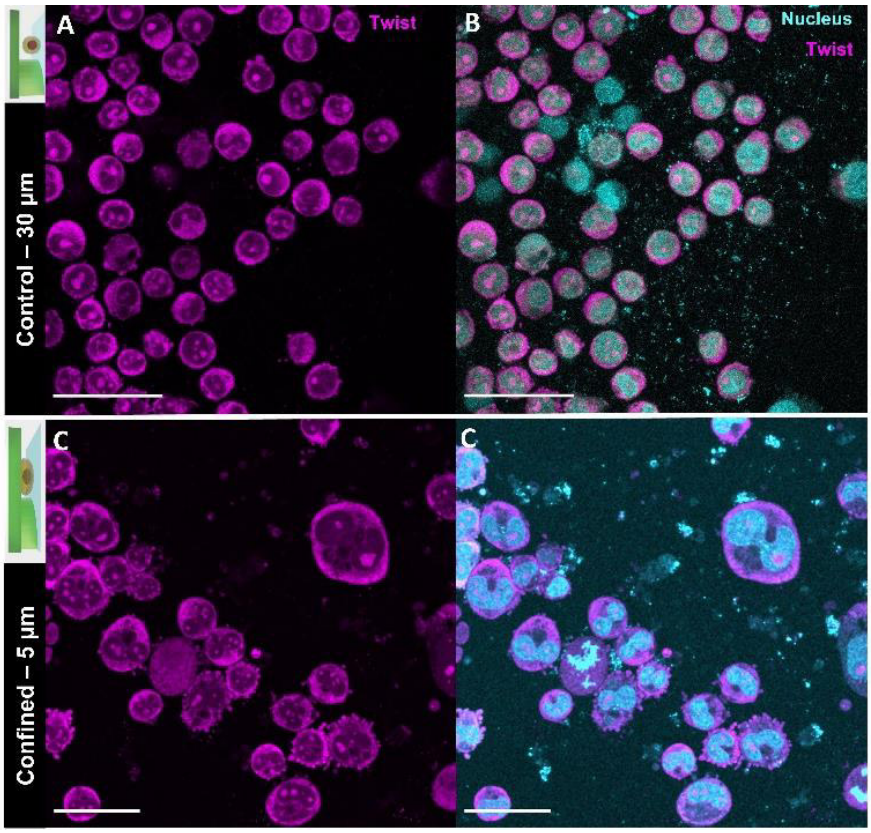


Figure 40 : Immunomarquage du facteur de transcription twist1 et des noyaux (nucgreen) sur des cellules TF1-BA après 72 h avec ou sans confinement 40x microcopie confocale. Echelle = 50 µm.

Aucun signal n'est retrouvé pour le canal dédié au signal de YAP (canal non présent sur les images) et un signal similaire entre l'état confiné et l'état non confiné est retrouvé pour Twist1 (en magenta sur les images). Le signal est à la fois cytoplasmique et nucléaire avec l'apparition de points localisés au sein du noyau. Les noyaux (cyan) sont comme en 3.5 très déformés à 5 µm.

4.3. Co-culture de cellules leucémiques TF1-BA et cellules stromale HS27A :

Afin d'obtenir des conditions plus physiologiques et contrer les problèmes d'hétérogénéité de la lamelle rencontrés sur les TF1-BA dus à leur faible adhésion sur fibronectine, des expériences ont été effectuées en co-culture. Une première couche de cellules stromales HS27A est ensemencée dans chaque puits et les cellules TF1-BA sont ensuite ensemencées par-dessus avant confinement Figure 41, A. Les cellules sont ensuite confinées à 9 µm pendant 3 jours, les contrôles sont laissés à 30 µm. Des marquages de YAP, d'actine et de noyaux sont réalisés *in fine*.

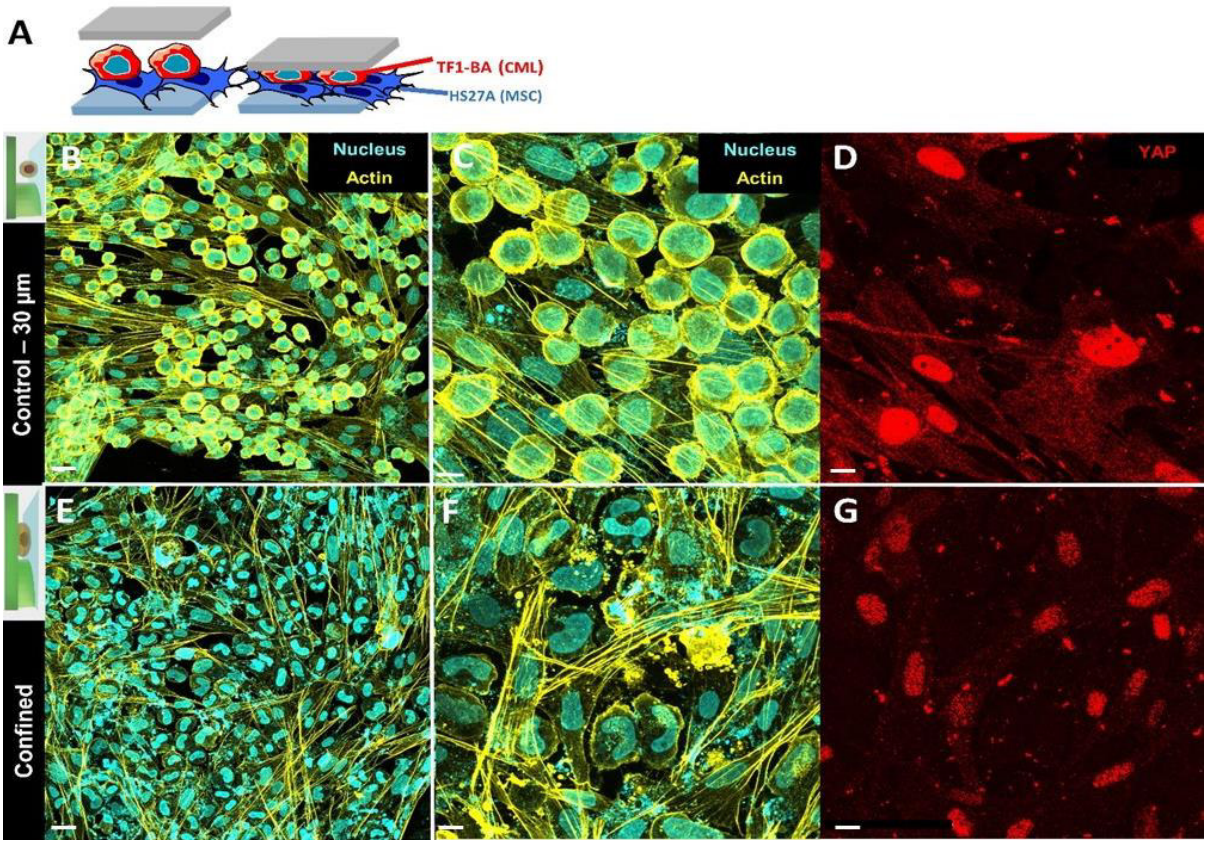


Figure 41 : Immunomarquage Co-culture de cellules stromales HS27A et cellules leucémiques TF1-BA avec et sans confinement après 72 h. Actine : Jaune, Noyaux : cyan, Yap : rouge. (A) Représentation schématique de la co-culture une couche de cellules HS27A et au-dessus des cellules TF1-BA. (B, C, E, F) Projection maximale en z, Actine : Jaune, Noyaux : cyan échelle 8 µm (C,D,E,F) et 15 µm (B,E) (D, G) YAP : rouge, seules les cellules stromales présentent un signal nucléaire, échelle 8 µm microscopie confocale 40x.

Encore une fois, on retrouve des noyaux très déformés et présentant majoritairement une forme circulaire pour les cellules TF1-BA sous confinement. Les cellules hématopoïétiques ont tendance à se regrouper en petits ilots sur le lit des cellules HS27A mais la distribution globale sur la lamelle est plus homogène. Un signal YAP nucléaire est exclusivement observé sur les cellules HS27A.

Après trois jours, aucun signal de YAP n'est obtenu pour aucune des conditions présentées dans ce manuscrit pour les cellules TF1-BA (avec et sans confinement, avec et sans cellules stromales, avec agarose rigide et agarose Ultra low gelling point).

4.4. Yes Associated Protein et MCF10A :

En parallèle, des marquages sont également effectués sur les cellules immatures mammaires MCF10A. Un marquage du facteur de transcription YAP est associé à un marquage classique des noyaux avec Nucgreen après deux heures puis après 24 h dans les systèmes.

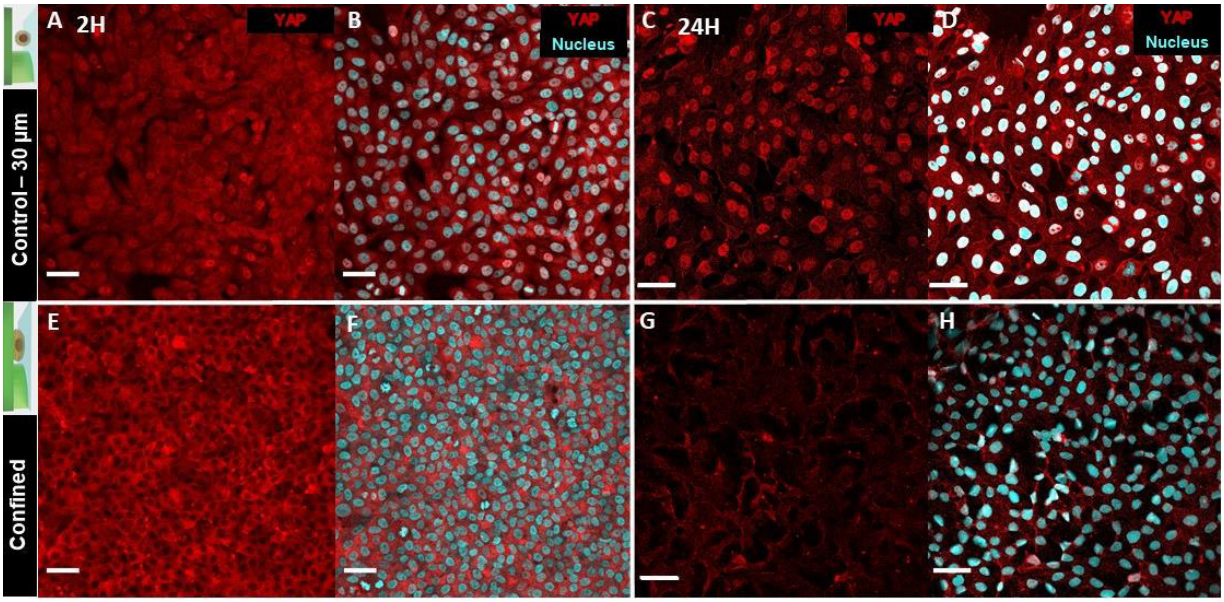


Figure 42 : Immunomarquage du facteur de transcription YAP (rouge) associé à un marquage nucléaire (cyan) sur les cellules mammaires MCF10A après 2 h (A,B,E,F) ou après 24 h (C,D,G,H). (A-D) Sans confinement, Yap est majoritairement nucléaire à 2 h et strictement nucléaire à 24 h. (E-H) Sous confinement, Yap est cytoplasmique après 2 h alors qu'il est dégradé à 24 h. Echelle = 50 µm.

A 30 µm, YAP (en rouge) est majoritairement nucléaire à 2 h et strictement nucléaire à 24 h. Sous confinement, le signal est cytoplasmique à 2 h alors que seulement un très faible signal est retrouvé après 24 h. La Figure 42 présente un exemple type des résultats obtenus dans chaque cas ; des images sont acquises sur l'ensemble de la lamelle présentant des zones à densité variable, le signal obtenu est semblable pour chaque cas.

Discussion :

Le principal enjeu de cette partie a donc été l'élaboration d'un nouveau système de confinement à l'échelle cellulaire. Il est constitué d'un hydrogel (l'agarose) présentant des piliers de hauteur contrôlée, maintenu en contact d'une lamelle de verre grâce à un système de serrage. Les cellules, ensemencées sur cette dernière, sont alors confinées à la hauteur des piliers par le gel. Le choix de l'agarose (et non du PDMS très largement utilisé dans le domaine de la microfluidique) et les nombreuses contraintes imposées ont compliqué son développement. De nombreux problèmes sont apparus et le temps nécessaire a été beaucoup plus important qu'initialement prévu. A chaque fois, il a fallu réfléchir au design, concevoir et réaliser les pièces et effectuer tous les tests pour les multiples versions. Des délais de livraison des pièces externalisées ont également retardé la validation du système de plusieurs mois. Le système est maintenant abouti, répond aux cahiers des charges et a été fabriqué en petite série afin de pouvoir avoir plusieurs conditions en parallèle. Toutes les parties (à l'exception du gel en agarose) sont stérilisables et réutilisables, ce qui augmente la reproductibilité et lui permet de ne pas être manipulateur-dépendant. Son utilisation ne nécessite aucune instrumentation spécifique ; à l'exception de la fabrication des wafers de silicium (élaborés par photolithographie en salle blanche) qui, une fois obtenus, peuvent servir plusieurs années. Il est maintenant complètement pris en main par une doctorante au sein de notre laboratoire travaillant sur les cellules colorectales HT29 mais également chez nos collaborateurs biologistes du CRCL pour la poursuite des deux projets.

Validation :

La validation du système a été réalisée à l'aide de trois types cellulaires différents : des cellules épithéliales mammaires non transformées MCF10A, des cellules hématopoïétiques immatures présentant ou non l'oncogène responsable de la leucémie myéloïde chronique respectivement TF1-GFP et TF1-BA et des cellules stromales HS27A, attestant ainsi de sa compatibilité avec des cellules adhérentes mais aussi non adhérentes. La contrainte appliquée est contrôlée, uniforme et stable sur plusieurs jours de culture. Aucun impact du système en lui-même n'a été retrouvé en termes de viabilité et de prolifération cellulaire, même après plusieurs jours de culture (jusqu'à 7 jours pour les cellules à inhibition de contact MCF10A). Il peut donc être utilisé pour découpler les conséquences d'un signal mécanique prolongé sur les cellules, sans problème de conditionnement de milieu de culture ou d'échanges gazeux. L'accès direct avec la réserve de milieu de culture et la porosité de l'agarose permettent d'obtenir un renouvellement efficace du milieu de culture aussi souvent que nécessaire. Les études actuelles de confinement à l'échelle cellulaire se cantonnent souvent seulement à quelques heures, cependant ceci ne peut pas permettre d'observer des phénomènes d'adaptation cellulaire qui peuvent se mettre en place *in vivo*.

Applications :

Les caractéristiques données au système permettent d'obtenir une vaste variété d'analyses possibles. Il est compatible avec la microscopie à haute résolution, des objectifs à faible distance de travail peuvent permettre de visualiser la population cellulaire au sein du système. Ses dimensions permettent également d'être compatible avec les tailles classiques des chambres environnementales, deux systèmes peuvent être placés côte à côte pour la réalisation de vidéo-microscopie. Des études dynamiques peuvent donc être envisagées en comparant directement un état confiné et un état non confiné par exemple. De plus, couplé à la porosité du gel, ceci permet d'effectuer et de visualiser des

immunomarquages directement *in situ.* C'est en avantage certain pour l'étude de types cellulaires faiblement adhérents où beaucoup de cellules sont perdues lors des différentes étapes de rinçage nécessaires. Des analyses moléculaires post confinement peuvent également être mises en place, la population cellulaire récoltée est suffisante pour des tests tels que le Western Blot et la qPCR. L'étude de la composition du sécrétome des cellules sous confinement, même si elle n'a pas été testée ici, pourrait également être envisagée en observant pas exemple la sécrétion de molécules ayant un rôle avéré dans le dialogue entre cellules cancéreuses et cellules du microenvironnement. Des paramètres supplémentaires peuvent également être ajoutés afin de complexifier les modèles d'études, combiner différents effets et se rapprocher un peu plus de la complexité retrouvée *in vivo*. Différentes populations cellulaires peuvent être mises en culture en même temps dans le système notamment des cellules stromales ou immunitaires. Leurs importances et leurs rôles dans la progression tumorale et résistance thérapeutique ne font plus aucun doute ; il est donc désormais primordial de les intégrer dans les études. Des agents thérapeutiques peuvent également être directement ajoutés, ce qui est difficile avec l'utilisation du PDMS et peut permettre d'évaluer directement l'effet combiné de molécules et de contraintes mécaniques.

Perspectives d'évolution du système :

Ici, un seul design et trois hauteurs de piliers (30 µm comme contrôle, 5 et 9 µm pour l'état confiné avec une ou deux populations de cellules) ont été utilisés mais il est évidemment possible de modifier cet aspect. Multiplier les expériences avec différentes hauteurs de confinement pourrait permettre de comprendre si les effets observés sous confinement sont linéairement augmentés avec le taux de déformation ou s'il existe une déformation seuil. Par exemple, sur des cellules Hela et l'utilisation du système de confinement en PDMS, un seuil de confinement a déjà été mesuré à 3,5 µm avant la rupture de la lamina nucléaire[258]. L'agarose, en comparaison à d'autres hydrogel, ne gonfle pas. Il est donc tout à fait possible de lui donner un rapport d'aspect ou une forme différente, à la seule condition qu'un moule soit réalisable. Il serait particulièrement intéressant, par exemple, d'imaginer une configuration permettant non plus simplement un confinement en z des cellules mais également dans les directions x et y. Un moule présentant différentes hauteurs de confinement pour un même support pourrait également être utile pour étudier l'existence de seuils pour différents effets. Il est assez difficile à mettre en place par le procédé utilisé actuellement en photolithographie mais peut par exemple être plus facilement créé par microfraiseuse. Il est en cours de tests au sein de l'équipe sur des cellules colorectales ; en un seul gel quatre zones sont définies : une zone contrôle à 30 µm, une à 5 µm, 9 µm, 11 µm et 13 µm. La microfraiseuse ne permet pas de descendre en dessous de 5 µm de hauteur, ceci n'est donc pas adapté pour des cellules de petites tailles. La rigidité du gel peut être modulée, en changeant simplement le type d'agarose et/ou sa concentration. Des tests préliminaires sur les cellules TF1-BA confinées à l'aide d'agarose Ultra-Low ont, par exemple, montré que la forme des noyaux des cellules confinées est différente suivant la rigidité. En abaissant la rigidité, les cellules peuvent alors déformer le gel. Des billes fluorescentes peuvent également être incorporées lors de la fabrication des gels en agarose, elles peuvent ensuite être utilisées (comme il sera présenté dans le chapitre suivant) afin de quantifier la dynamique de déformation du gel induite par les cellules (technique de Traction Force Microscopy, TFM). Ce type d'expériences pourrait permettre de déceler une éventuelle adaptation des cellules sous confinement, qui pourraient se réorganiser et changer de phénotypes afin de subir moins de forces de compression avec le temps et d'obtenir les échelles de temps nécessaires à cette adaptation pour se mettre en place. Dans le système actuel, l'agarose est utilisée pure et ne fournit donc aucune possibilité d'adhésion aux cellules. Néanmoins, comme présenté dans le chapitre

2, il est possible d'y incorporer des molécules permettant aux cellules d'y adhérer. Le rôle de différentes protéines de la matrice extracellulaire pourrait donc être étudié pour les cellules sous confinement, ajoutant encore un paramètre rencontré par les cellules *in vivo*. Pour le moment, même si la possibilité de changer la rigidité du gel a déjà été testée, le substrat a toujours été une lamelle de verre rigide. Il serait alors intéressant d'envisager un coating de la lamelle par un matériau moins rigide afin d'étudier l'effet non seulement du confinement mais aussi de la rigidité de la matrice extra cellulaire. Cette étape demande encore des étapes de développement mais la possibilité de prétraiter les lamelles de verre par une couche d'agarose ou de PGMEA ne semble pas insurmontable avec le système en l'état actuel.

Baisse de prolifération sous confinement :

Outre la validation du système de confinement, les résultats obtenus ouvrent la voie à différentes perspectives. Une baisse de prolifération a été mesurée pour les trois types cellulaires après 1 jour, 2 jours ou trois jours de confinement par suivi en microscopie. Ceci a également été attesté par une baisse de la protéine Cycline B1 chez les cellules HS27A par Western Blot et une baisse du nombre de cellules marquées à l'EDU pour les cellules MCF10A. Il est important de noter cependant que les trois modèles cellulaires ont été confinés à la même hauteur (ie 5 µm) ce qui ne représente pas le même taux de déformation pour chaque type (pour les TF1 aux alentours de 50%, pour les MCF10A de 40%).

Ces résultats sont en accord avec la littérature ; des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des systèmes de confinement en PDMS[99, 100] ou par microcopie par force atomique[96] où des retards de mitose ont été observés. Même si cela n'était pas l'objectif premier des projets impliqués dans cette partie, il serait intéressant de se focaliser un peu plus sur les modes de division sous confinement. Différentes études ont déjà été réalisées dans cette optique et ont montré par exemple que des défauts de division, des changements dans la mise en place de l'axe de division étaient observés sous confinement[98, 99, 257, 272], imputables notamment à un arrondissement limité. La polarisation en métaphase indispensable au processus mitotique peut être affectée par le microenvironnement et notamment pas ses propriétés mécaniques[97]. Dans le contexte des deux projets initiés avec le CRCL (modèle cancer du sein et Leucémie Myéloïde Chronique), il serait par exemple particulièrement intéressant de comparer le processus de mitose sous confinement des cellules TF1-GFP modèles de cellules immatures hématopoïétiques avec les cellules TF1-BA modèles de cellules souches de leucémie myéloïde chronique ou pour des cellules mammaires MCF10A et les différentes lignées modélisant différents stades de tumeurs du sein. Il ne serait pas étonnant de retrouver des capacités accrues des cellules cancéreuses à se diviser sous contrainte. Une étude récente a montré que l'induction d'un unique oncogène RasV12 augmentait les capacités des cellules à conduire une division complète sous confinement[149]. Ils ont également montré que l'induction de cet oncogène induisait une baisse de la rigidité des cellules à l'interphase. Dans la littérature et par des analyses effectuées au sein de l'équipe du CRCL sur les lignées TF1-GFP et TF1-BA en particulier, une rigidité plus importante est retrouvée à l'inverse pour la population leucémique. Des analyses quantitatives de la progression mitotique, de l'apparition d'aberrations, de divisions asymétriques comme dans[99] , de cassures de l'ADN (marquage γH2AX), de problèmes de ségrégation des chromosomes ou de micronuclei pourraient peut-être permettre de mettre en lumière certaines différences entre les lignées[257]. Il serait utile de suivre les divisons sous confinement pendant plusieurs jours, ce qui permettrait de regarder les conséquences après plusieurs divisions, et par exemple d'observer la capture de micronuclei après quelques divisions. Ceci pourrait participer à l'hétérogénéité tumorale. De plus, dans le contexte des cellules souches

cancéreuses, il serait également important de regarder si la baisse de prolifération pourrait être imputée à l'augmentation de cellules en quiescence.

Déformation nucléaire :

Des noyaux présentant une aire projetée et une forme largement modifiée ont été observés pour les cellules leucémiques TF1-BA en culture seules ou en co-culture avec les cellules stromales HS27A. Cette déformation semble beaucoup moins marquée pour les cellules hématopoïétiques TF1-GFP et les cellules MCF10A qui elles présentent une forme plus allongée et cylindroïde. La modification de la forme du noyau a déjà été documentée dans plusieurs pathologies dont le cancer[271] l'influence du microenvironnement sur la déformation des noyaux a déjà été observée[272, 273]. Le changement de morphologie semble être toujours relié à un remodelage du cytosquelette[274] et de condensation de la chromatine[275]. Le lien entre la contractilité de l'actomyosine et la déformation des noyaux dans la régulation du transport nucléaire des molécules de signalisation a été souligné ces dernières années[276]. Des études dynamiques seraient maintenant nécessaires pour comprendre comment la déformation du noyau et la mécanosensibilité module l'expression des gènes[277]. Des analyses dynamiques, profitant de la compatibilité du système avec la videomicroscopie à haute résolution, permettraient de suivre la déformation des noyaux sur plusieurs jours à l'aide de constructions fluorescentes comme l'histone ou la lamina A/C (qui a une influence sur la rigidité du noyau[278] et sur laquelle l'influence des forces mécaniques n'est pas encore complètement comprise[279]) .

YAP :

Un autre aspect intéressant concerne les résultats obtenus en immunofluorescence sur le facteur de transcription YAP. Ce facteur de transcription est un élément de mécanotransduction avéré et dérégulé dans divers cancers[104] et notamment dans le cadre du cancer du sein[280]. L'intérêt autour de sa régulation est grandissant (notamment comme potentielle cible thérapeutique) mais son mécanisme d'action n'est pas encore clairement établi. Il serait régulé pas différents signaux mécaniques tels que la rigidité de l'environnement, les forces de tension, les contraintes de cisaillements, la surface d'adhésion et récemment la forme du noyau[281–283]. Nos résultats montrent clairement un effet du confinement sur l'activité de YAP. Le signal nucléaire retrouvé dans nos conditions de contrôle est en accord avec la littérature qui décrit une activation de YAP pour un substrat rigide[283]. Le confinement induirait ensuite son inactivation et un signal cytoplasmique dès 2 h de confinement. Le peu de signal obtenu à 24 h correspondrait ensuite à sa dégradation par le protéasome. Ceci serait également en accord avec la baisse de prolifération retrouvée sous confinement[284]. Une étude très récente sur des cellules d'ostéosarcome et glioblastome a permis d'observer le même phénomène d'inactivation de YAP sous confinement lorsque les cellules passent au travers de microcanaux[285]. La même chose est observée pour des cellules de fibrosarcomes confinées par un système de PDMS et peut s'apparenter à ce qui a été observé sur des monocouches de cellules oscillantes[286]. Il serait également très intéressant de comparer ces résultats impliquant YAP sur des cellules non adhérentes où l'organisation du cytosquelette d'actine est différente comme pour les cellules TF1 GFP et TF1 BA. Ce facteur de transcription, largement étudié pour les cellules adhérentes et les tumeurs solides, l'est beaucoup moins pour ce type de cellules hématopoïétiques. Cependant, quelques études récentes suggèrent tout de même un rôle comme régulateur d'apoptose mais également un effet combiné avec l'oncogène Bcr-Abl[287] ou le traitement par Imatinib dans le cas des leucémie myéloïdes chroniques[288].

Il serait aussi important de tester l'effet de la leptomycyne B sous confinement, l'export nucléaire devrait être ainsi bloqué et Yap devrait rester nucléaire même avec des forces de compression[283]. De plus, la présence de Yap dans le signal ne correspond pas forcément à son activation il serait donc important de regarder l'expression de certains de ses gènes cibles. Le signal de Yap serait également à mettre en parallèle avec l'architecture du cytosquelette dans nos conditions avec et sans confinement[280]. La forme du noyau a déjà été observée comme un facteur d'influence du signal de Yap, il serait donc intéressant d'utiliser notre système en agarose rigide mais également avec des agaroses moins rigides. Si ces derniers peuvent être déformés par les cellules ils n'imposent plus la même déformation nucléaire et potentiellement plus la même régulation du signal de YAP. De plus, une étude récente montre l'influence de l'encombrement macromoléculaire sur la translocation de ce facteur de transcription en réponse à un choc osmotique[289].

Analyses phénotypiques :

Il serait également intéressant d'étudier les changements phénotypiques des cellules sous contrainte et de détecter si une éventuelle adaptation se met en place pour des expériences à long terme. Des études ont décelé un amollissement des cellules sous compression et un gonflement[290, 285]. Ce phénomène pourrait être potentiellement relié à l'activité de YAP et au phénomène d'encombrement nucléaire. Une analyse de volume cellulaire par exclusion de fluorescence serait tout à fait adaptable au système et permettrait de sonder s'il existe une régulation du volume qui entraîne une modification de la rigidité cellulaire. De plus, il serait intéressant de comparer les analyses sur des cellules cancéreuses et leurs homologues du tissu sain (par exemple les cellules TF1-GFP et TF1-BA). Il a déjà été suggéré que les cellules cancéreuses pouvaient répondre différemment aux stimulations mécaniques[149, 291]. Des analyses par AFM au sein de l'équipe du Dr Maguer-Satta ont déjà montré une différence de rigidité intrinsèque des cellules entre ces deux populations, suggérant déjà un comportement mécanique altéré par l'oncogène BCR-Abl et donc un potentiel impact des stimulations mécaniques différentes.

Mécanisme de résistance :

Un autre aspect important, qui n'a malheureusement pas pu être réellement débuté dans le temps imparti de cette thèse, est l'évaluation de l'impact des contraintes mécaniques dans le cadre de la résistance thérapeutique des leucémies myéloïdes chroniques. Comme présenté dans le chapitre 2, tous les mécanismes rentrant en jeu ne sont pas encore connus. L'équipe de Véronique Maguer-Satta travaille notamment sur le rôle des BMP (Bone Morphogenic Proteins) dans ces processus de résistance. Ils ont montré que chez les patients atteints de LMC, cette voie est dérégulée et que cette altération persiste sous traitement[292]. Un mécanisme de survie des cellules souches leucémiques se met en place chez les patients résistants impliquant différents facteurs de cette voie comme une surexpression d'un récepteur (BMPR1b) et une production augmentée de ligand BMP 2 et 4 par les cellules leucémiques elles-mêmes et les cellules stromales[293]. Les BMPs sont des éléments forts du dialogue entre les cellules de l'environnement et les cellules souches cancéreuses, leur étude est complexe car mettant en jeu une synergie de différents éléments et des signaux parfois contradictoires. Dans un contexte physiologique, il a été montré que des signaux mécaniques peuvent réguler la transcription de différents ligands. Il semble donc extrêmement intéressant d'étudier l'impact des contraintes mécaniques sur le processus de résistance mis en lumière par l'équipe du CRCL, en étudiant le comportement des cellules leucémiques sous confinement mais également les cellules stromales. Des études du sécrétome pourraient par exemple permettre de quantifier les ligands de BMP sous contrainte, des marquages

immunofluorescents pourraient ensuite permettre de cibler certains éléments clefs des voies de signalisation de BMP et comprendre leur évolution avec l'influence des forces mécaniques. De plus, maintenant que le système est au point et reproductible, il serait intéressant d'analyser plus en détails l'expression de gènes mécanosensibles, souches et impliquant la voie BMP par qPCR.

Chapitre 4 : Un modèle 3D, le sphéroïde

Comme présenté dans le premier chapitre d'introduction, un modèle de culture 3D de cellules semble particulièrement intéressant pour modéliser une tumeur solide : le sphéroïde. Même si l'intérêt de la communauté pour ce système va croissant, il est évident que son utilisation est plus complexe que la culture cellulaire classique en 2D : en termes de production homogène d'échantillons mais également d'analyses. Nous présentons dans cette partie, un système de micro-puits qui présente un intérêt dans la production mais aussi l'analyse de sphéroïdes à moyen débit. A l'instar du chapitre 3, celui-ci débute par la présentation du système développé et sa conception. La deuxième partie permet de présenter quelques types d'analyses permises par le microsystème. Dans la dernière partie, nous présentons les différentes techniques testées pour appliquer des contraintes mécaniques sur les sphéroïdes et les résultats obtenus. Deux modèles biologiques sont utilisés ici : le cancer colorectal et le glioblastome (cancer du cerveau). Les études concernant ce dernier, ont été mises en place en collaboration avec l'équipe « Diversité du transcriptome des cellules souches » du CRCL.

1. Présentation du système de micropuits

1.1. Systèmes de production de sphéroïdes existants

De multiples techniques de génération de sphéroïdes ont émergé ces dernières années. La taille, la vitesse de formation et le temps de culture peuvent influencer la complexité et l'organisation des sphéroïdes ; il est donc primordial de contrôler ces paramètres tout en gardant des conditions de culture physiologiques afin d'obtenir des analyses robustes et reproductibles. Le tableau ci-dessous issu d'une revue récente résume les différentes techniques utilisées actuellement pour la production de sphéroïdes. La génération de sphéroïdes se base sur l'induction de l'agrégation des cellules entre elles, en promouvant l'interaction cellule-cellule au détriment de la liaison cellule-surface.

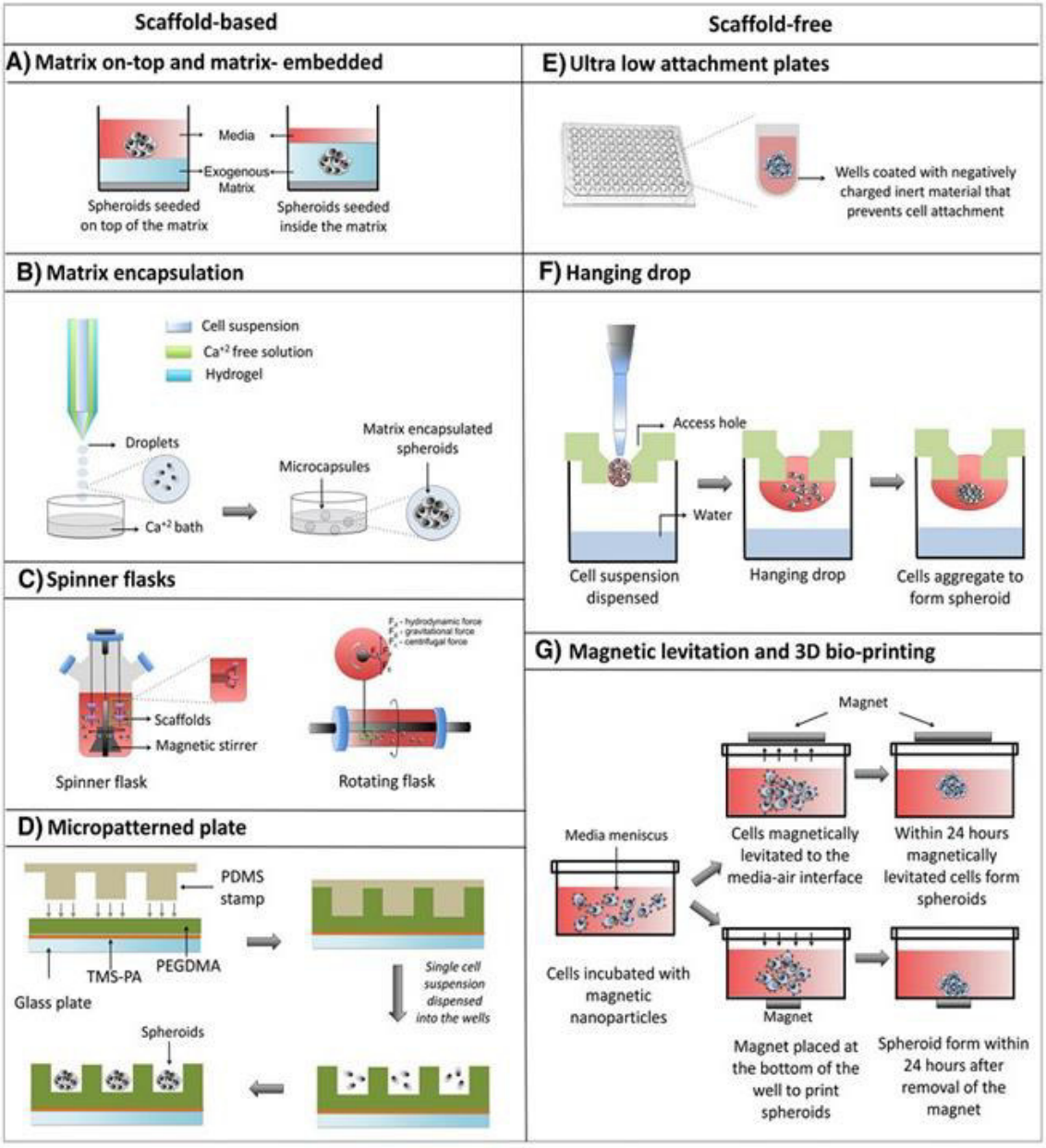


Figure 43 : Récapitulatif des différentes méthodes de génération de sphéroïdes Issu de[294].

Une des stratégies est d'ensemencer les cellules sur une surface non adhérente et de les garder en culture sous agitation afin d'induire l'agrégation spontanée des cellules entre elles[295]. Une couche d'agarose ou d'un polymère hydrophobique polyHema peut être utilisée pour le traitement de surface de matériel de culture classique. Des solutions commercialisées par Corning permettent aussi d'obtenir des boîtes de pétri et flasques non adhérentes prêtes à l'emploi[296]. Les cellules peuvent également être gardées en suspension dans une solution de matrice liquéfiée[297]. C'est une technique très simple à mettre en place mais qui ne permet pas de contrôler la taille et le nombre de sphéroïdes produits Figure 43A.

L'utilisation de bioréacteurs présente une méthode de production haut-débit : l'auto-agrégation des cellules est ici induite par une agitation continue permise par un agitateur magnétique à l'intérieur de la flasque ou par rotation de la flasque Figure 43C. Peu de manipulations sont nécessaires pour la

production de grandes quantités de sphéroïdes qui peuvent être gardés en culture sur du long terme. En revanche, la taille des agrégats produits est hétérogène et le suivi individuel des sphéroïdes est impossible[298]. De plus, les cellules sont continuellement soumises à des forces hydrodynamiques ce qui peut influer sur leur comportement, même si des bioréacteurs développés par la NASA présentent des contraintes de cisaillement réduites basés sur des méthodes de microgravité[299].

L'auto-assemblage des cellules peut également être induit par l'utilisation de plaque multi puits à faible adhésion. La surface est rendue non adhérentes par coating d'agarose, PolyHema et le regroupement des cellules au centre est obtenu en utilisant des puits ronds ou coniques : Figure 43E. C'est une technique largement utilisée[300–302] car simple à mettre en place et reproductible ; des solutions prêtes à l'usage sont commercialisées par exemple chez Corning, Biosciences, Grenier bio one… Cependant, le nombre de sphéroïdes produit est relativement bas (un seul par puits, classiquement plaque de 96 puits) et le système est incompatible avec des techniques de microscopie haute résolution.

Afin d'augmenter le rendement de production, des techniques de micropatterning Figure 43D ont été mises en place qui permettent la production de centaines de sphéroïdes uniformes en un seul pipetage grâce à un réseau de micropuits. Des cellules sont ensemencées et par agitation ou sédimentation celles-ci se placent au fond de ces puits non-adhérents et après 24 h ou 48 h d'incubation elles s'auto-assemblent et forment des sphéroïdes. La taille des puits et la densité d'ensemencement permettent de contrôler la taille des sphéroïdes créés. Il est possible d'incuber et de laver les sphéroïdes avec différentes solutions sans les perdre ou les détériorer mécaniquement. Différents systèmes ont déjà été développés et certains sont déjà commercialisés. Des matériaux photosensibles sont utilisés (PGMEA[303, 304]) mais nécessitent alors une ingénierie chimique importante pour un bon transfert du motif, tout en garantissant la biocompatibilité des matériaux utilisés

La société Stemcell propose une solution directement prête à l'usage : aggrewell[305–307.] Ceci peut se révéler relativement coûteux pour une utilisation quotidienne et nécessite un pré-traitement afin d'empêcher l'adhérence des cellules sur le substrat.

Des systèmes d'agrégation en gouttes pendantes ont également été imaginés Figure 43F: ils permettent d'obtenir des sphéroïdes homogènes en taille[308]. Néanmoins, c'est un des procédés qui nécessite le plus de manœuvres et il est important de contrôler l'évaporation du milieu de culture de la goutte durant l'agrégation, car celle-ci pourrait affecter la viabilité des cellules pas osmolarité. Une technique qui permet de maîtriser cet élément a été développée et est commercialisée par 3D biomatrix[309, 310] mais demeure assez exigeante.

Les sphéroïdes peuvent également être produits à partir d'une méthode d'encapsulation Figure 43B. Des gouttes de cellules et d'hydrogel sont dispersées dans un bain de calcium, l'hydrogel se gélifie alors et permet la formation de microcapsules piégeant les cellules en suspension. Différents procédés micro-fluidiques permettent de mettre en place cette méthode[311, 312] . Des hydrogels à peptides auto-assemblant gélifiant sans utilisation de bain de calcium ou de méthode de double émulsion à l'huile ont également été développés[313, 314]. Ces techniques d'encapsulation permettent la formation de sphéroïdes homogènes mais nécessitent souvent un certain nombre de manipulations. Si les sphéroïdes doivent être gardés en culture à long terme une étape doit être ajoutée afin d'enlever la microcapsule qui pourrait induire un confinement de l'agrégat lors de sa croissance.

L'utilisation de forces externes a également été envisagée pour guider l'assemblage des cellules Figure 43G. L'emploi de particules et de champs magnétiques[315, 316] mais également d'ultrasons[317] ou de dielectrophorèse[318] peuvent aider à la formation de sphéroïdes. Le rendement de ces méthodes peut être relativement élevé et les agrégats ainsi produits ne présentent pas de conséquences physiologiques perceptibles dues aux différentes stimulations physiques mais elles requièrent cependant une instrumentation assez spécifique.

Différents systèmes microfluidiques[319–326] ont également été développés. Ils permettent la production d'une centaine de sphéroïdes en parallèle et offrent la possibilité de suivi individuel par microscopie. En revanche, ils sont tous fabriqués en PDMS qui peut alors présenter les mêmes désavantages que ceux exposés en Partie 2. Ils nécessitent la mise en place de méthodes de perfusion pas toujours aisées et transférables et ne permettent pas de récupérer les sphéroïdes *in fine* pour des analyses moléculaires.

Des techniques de plus en plus ingénieuses sont développées mais peuvent présenter des difficultés en termes de mise en place, rapidité, reproductibilité et rendement et n'offrent pas toutes les mêmes utilisations. Il est donc important de bien sélectionner la procédure de génération des sphéroïdes en fonction des besoins de l'étude. Peu de techniques se révèlent réellement adaptées à la microscopie haute résolution très largement utilisée dans notre équipe ; il a donc été décidé de développer une nouvelle méthode, inspirée de la méthode de micropatterning Figure 43D et utilisant le micro-moulage d'un hydrogel classique : l'agarose, il est présenté en détail dans le paragraphe suivant.

1.2. Description du dispositif

Une technique de fabrication de micropuits en hydrogel a été développée au sein du laboratoire (brevet FR 1870349 déposé) afin de répondre à des besoins pas encore totalement satisfaits par les systèmes présentés précédemment.

L'idée développée au sein de l'équipe a donc été de garder ce principe de micropuits mais une fois encore d'utiliser l'agarose pour ces nombreux avantages précédemment présentés. Des moules sont créés sur un wafer de silicium par photolithographie (voir Matériel et Méthodes pour les détails de la technique). Cette fois, l'agarose n'est pas directement moulée sur le wafer mais des moules en PDMS vont permettre de faire l'intermédiaire entre les deux : Figure 44. Ceci permet d'une part de conserver les wafers en silicium plus longtemps et d'autre part d'avoir des patrons bien plus maniables et pratiques pour le moulage de l'agarose. A noter que cette solution a également été testée dans le développement du système présenté dans le chapitre 3 mais ne s'est pas révélée satisfaisante pour cette partie car les rapports d'aspect et planéité de l'échantillon nécessitaient une rigueur plus importante qui n'est pas forcément parfaitement atteinte par le transfert par les moules en PDMS. Afin d'obtenir un système compatible avec la microscopie haute résolution, un traitement chimique a été mis en place afin de faire adhérer l'agarose sur une lamelle de verre. Les lamelles de verre sont fonctionnalisées avec l'amino-propyl-tri(ethoxy)silane (APTS) qui crée des groupements $NH3^+$ en solution. Cet excès de charges positives permet l'adhésion de l'agarose sur la lamelle fonctionnalisée, par interactions électrostatiques. Sans ce traitement, le gel d'agarose flotte dans le milieu de culture.

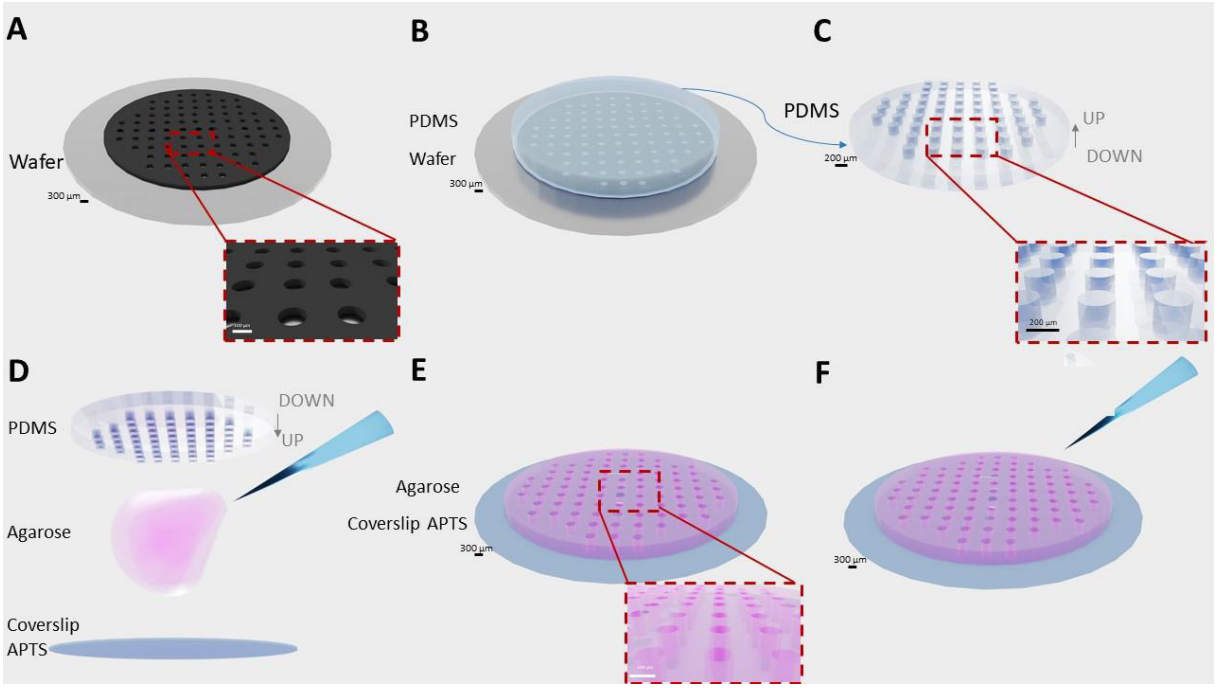


Figure 44 : Représentation de la fabrication des puits en agarose. (A) Wafer de silicium réalisé par photolithographie (B) Fabrication d'un contre moule en PDMS à l'aide du wafer (C) Représentation du contre moule en PDMS obtenu (D) Moulage des micropuits d'agarose à l'aide du contre moule PDMS sur une lamelle de verre traitée par APTS, ceci permet l'adhésion de l'agarose. (E) Représentation du réseau de micropuits obtenu après gélification de l'agarose, en adhésion sur la lamelle de verre (F) Stérilisation par rayonnements UVs et ensemencement des micropuits.

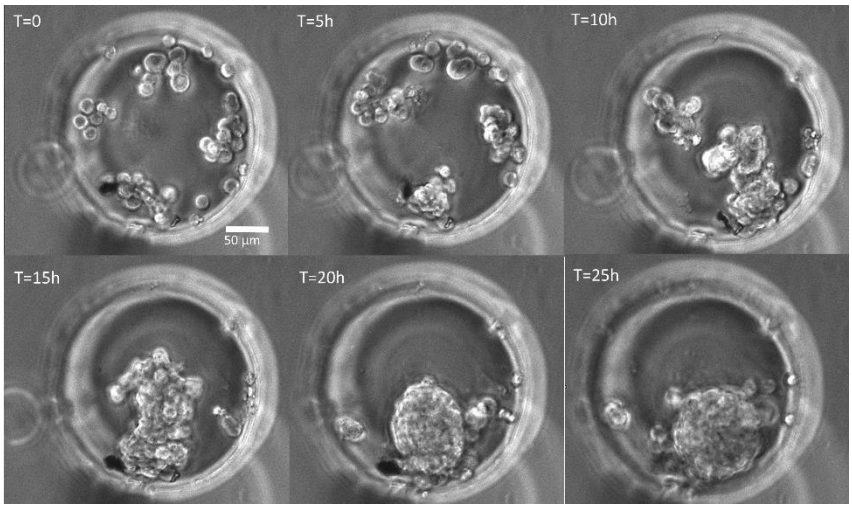


Figure 45 : Formation d'un sphéroïde par agrégation de cellules HCT116 au fond d'un puits d'agarose, (Ø200 µm) en agarose (standard 4% m/v). Echelle = 50 µm.

Le recours à des micropuits formés en agarose pour la formation de sphéroïdes commence à se développer[327, 328] ; une solution commerciale a également été pensée par microtissues, Inc[329]. La compagnie commercialise des moules réutilisables permettant le moulage des micropuits en agarose. Cependant le réseau de micropuits n'est jamais attaché à un substrat, ce qui oblige à transférer les sphéroïdes pour toute analyse fine par microscopie optique.

La première construction du système est d'utiliser une grande lamelle de verre et de créer un puit à partir d'un tube Falcon de 50 ml sectionné à une hauteur de 1.2 mm et d'un joint silicone placé à l'extérieur, de la même manière que la version 1 du système de confinement Figure 23.

La deuxième solution est de recourir à des plaques classiques de culture 24 puits, de percer à la scie cloche chacun des puits et de venir remplacer le fond par des lamelles de verre de diamètre 14 mm. Différentes solutions ont été alors testées pour coller correctement la lamelle de verre et maintenir une bonne stérilité ; la plus efficace a été d'utiliser une colle NOA biocompatible (NOA 81, Norland Optical adhesive) qui polymérise en quelques secondes sous rayonnements UV. Cette combinaison permet ainsi d'obtenir 24 réplicas de plus d'une centaine de sphéroïdes (130 sphéroïdes sur le design actuel de puits de diamètre 200 µm) tout en gardant des dimensions classiques de culture cellulaire compatible avec tous les supports et accessoires de microscopie.

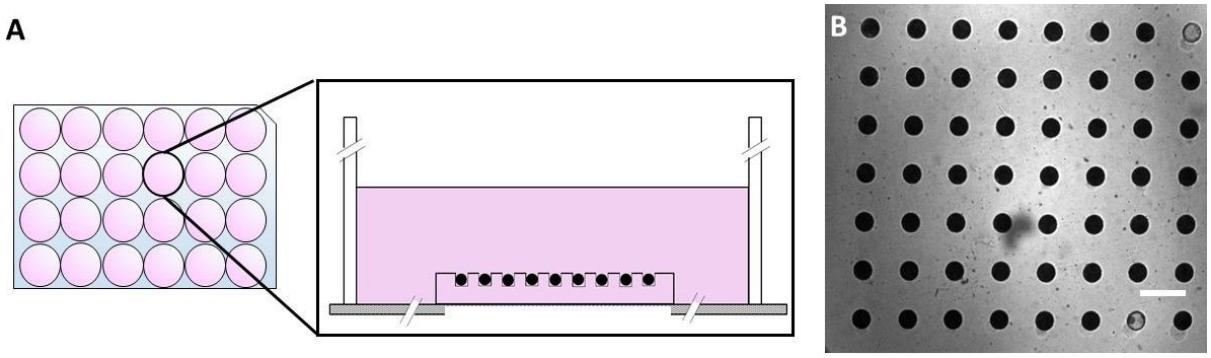


Figure 46 : Représentation de la configuration des micropuits. (A) Les micropuits sont positionnables dans une plaque 24 puits classique (B) Image de sphéroïdes HCT116 obtenus à l'aide d'un système en agarose standard, 6 jours après ensemencement des cellules. Echelle=600 µm.

Diverses applications sont compatibles avec ce mode de production de sphéroïdes, plusieurs d'entre elles sont décrites dans la partie suivante. Suivant l'utilisation, la solution une ou deux est préférée, le type d'agarose utilisée varie également avec les applications et sera précisé dans chaque cas.

2. Applications

Pour la suite de ce chapitre, sauf mention contraire, les micropuits ont un diamètre de 200 µm et sont fabriqués en agarose standard 4%. De plus, par souci de simplicité, le terme de neurosphère ou colosphère ne sera plus utilisé, il lui sera préféré le nom plus généraliste de sphéroïde qui est applicable à tous les types cellulaires utilisés dans cette étude.

2.1. Suivi de prolifération

La principale particularité de notre système de micropuits réside dans sa compatibilité avec la microscopie haute résolution, permise par leur adhésion sur une lamelle de verre. Elle autorise par exemple, le suivi individuel d'un sphéroïde et cela pour plus d'une centaine d'agrégats en parallèle. Par un seul pipetage, le système permet donc la formation d'une centaine de sphéroïdes de tailles similaires. La concentration cellulaire de départ permet de moduler la taille initiale des sphéroïdes. Le diamètre des puits en agarose peut également varier suivant le moule utilisé pour l'agarose. L'idée est ici de regarder si la présence d'une sous-population de cellules souches de glioblastome au protéasome inactif (qui serait synonyme d'un état souche) a une influence sur la croissance des agrégats. Ce marquage est explicité dans le chapitre 2. Pour cela, l'aire de sphéroïdes issus de cellules N14 a été évaluée durant près de 6 jours. Le suivi a été débuté après la formation des sphéroïdes. Une image par épifluorescence puis une image en lumière blanche ont été acquises toutes les trente minutes à chaque position. Pour les sphéroïdes présentant un signal fluorescent, la mise au point a été effectuée sur le canal de fluorescence, alors que pour ceux ou aucune fluorescence n'est détectée, le plan médian du sphéroïde est enregistré comme référence.

Trois phénotypes différents sont apparus pour les sphéroïdes avec un signal en fluorescence, ils sont représentés sur la figure ci-dessous.

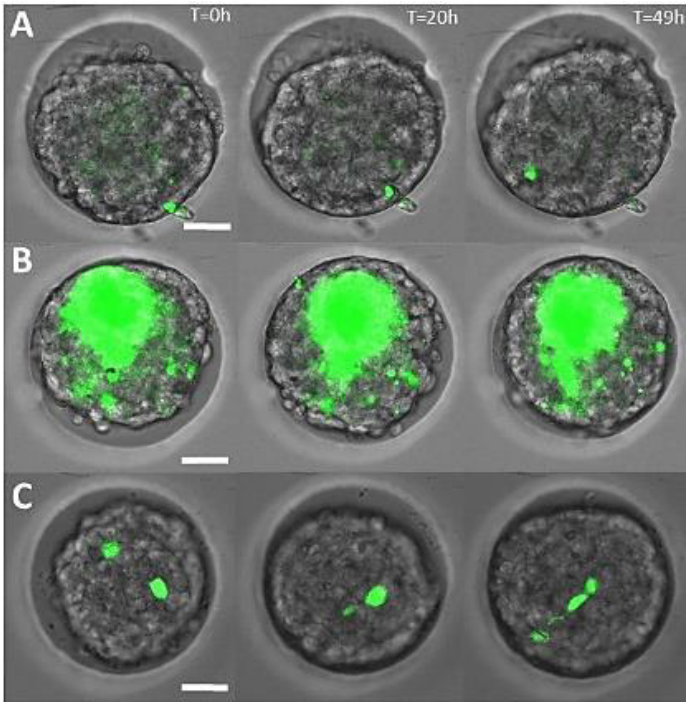


Figure 47: Différents phénotypes observés pour les cellules N14 Zsgreen. (A) Expression fluorescente diffuse (B) Petits points de fluorescence ne correspondant pas à la taille d'une cellule (C) Cellules fluorescentes dynamiques. Images en épifluorescence et lumière blanche. Echelle =50 µm.

Certains sphéroïdes présentent une expression diffuse de la fluorescence Figure 47A qui ne semble pas évoluer au cours du temps (même « tâche » et qui reste au même endroit du sphéroïde). Pour d'autres, seulement des petits points de fluorescence sont observés, bien inférieurs à la taille d'une cellule et présents tout au long de l'acquisition Figure 47B. Enfin, pour un dernier profil, une fraction dynamique du sphéroïde apparait Zsgreen positive avec une taille et un comportement qui peut s'apparenter à celui d'une cellule individuelle Figure 47C. Les deux premiers profils sont assez difficiles à interpréter. Nous nous sommes donc intéressés seulement au dernier profil, qui correspond au marquage d'une sous-population des cellules du GBM présents en faible proportion au sein des sphéroïdes. Les deux autres cas, moins fréquemment rencontrés, sont exclus de nos analyses.

Nous avons suivi au cours du temps la croissance des agrégats au sein de nos systèmes de micropuits par vidéo-microscopie. L'analyse de chacun des sphéroïdes est stoppée lorsque celui- ci atteint un diamètre de 190 µm afin qu'aucun biais ne soit apporté par le fait que le sphéroïde soit contraint par les murs d'agarose. Ainsi, l'aire des sphéroïdes est analysée toutes les 30 minutes pour 64 agrégats différents.

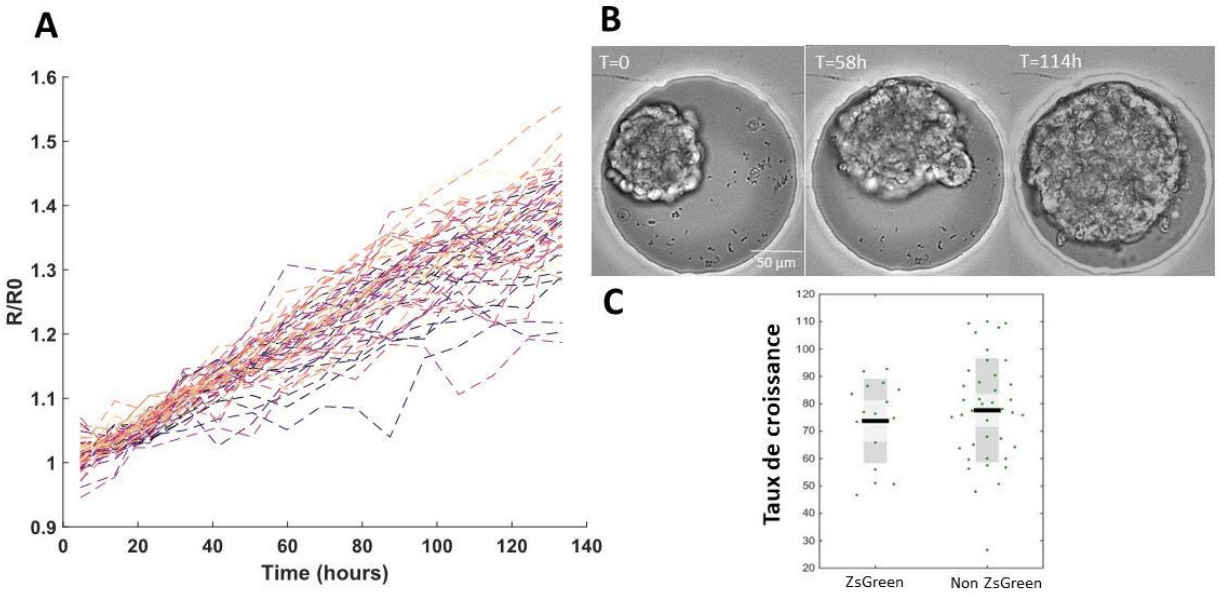


Figure 48 : Suivi de prolifération de sphéroïdes N14. (A) Aires normalisées obtenues par analyse automatique, n=64, intervalle de temps des prises d'images=30 min, temps total d'acquisition = 114 h. (B) Exemple typique de prolifération d'un agrégat par vidéo-microscopie. Echelle = 50 µm (C) Taux de croissance des N14 avec ou sans cellule ZsGreen positive : 100*(aire finale-aire initiale)/aire finale).

Le taux de croissance des sphéroïdes (100*(aire finale – aire initiale) / aire finale) n'est significativement pas différent entre la proportion des sphéroïdes présentant des cellules Zs Green positives au protéasome inactif et ceux n'en présentant aucune. La classification des sphéroïdes n'évolue pas au cours des 138 h de culture : aucune cellule ne semble apparaître fluorescente pour les agrégats qualifiés de « non ZsGreen » au lancement de l'expérience et les différents profils de fluorescence s'avèrent également constants. Toutefois, cette information est à prendre avec prudence. En effet, l'acquisition n'a été effectuée que pour un seul plan en z or les sphéroïdes de N14 sont très dynamiques en comparaison de ceux issus des cellules HCT116 initialement utilisés. Un suivi plus rigoureux de la fluorescence nécessite donc une acquisition en 3 dimensions.

En parallèle, les deux populations ont été triées par FACs (fluorescence activated cell sorting) par nos collaborateurs puis gardées en culture plusieurs jours en flasques non-adhérentes (des agrégations de sphéroïdes doivent alors avoir lieu et peuvent polluer l'analyse). Aucune différence en termes de taille de sphéroïdes n'a été observée et aucune fluorescence n'a été détectée pour la population classée ZsGreen négative. Ces deux informations confirment donc nos observations. La présence de cellules Zsgreen positives ne semble pas avoir de conséquence sur la croissance globale du sphéroide.

2.2. Suivi de cellules au sein de sphéroïdes à l'aide de marqueurs fluorescents

Nous avons ensuite décidé de suivre la dynamique des cellules Zsgreen positives au sein d'un sphéroïde. Pour cela, une acquisition en 3 dimensions a été effectuée par épifluorescence et lumière blanche pendant deux jours pour 9 sphéroïdes présentant le phénotype n°3 Figure 47C. Pour chaque sphéroïde, chaque cellule Zsgreen positive est suivie en 3 dimensions au sein du sphéroïde tout au long de l'acquisition. Une analyse mise en place à l'aide du logiciel Matlab permet de suivre automatiquement chaque entité fluorescente. 22 cellules ont été suivies de cette façon et une projection en 2D de la trajectoire 3D est donnée sur la Figure 49.

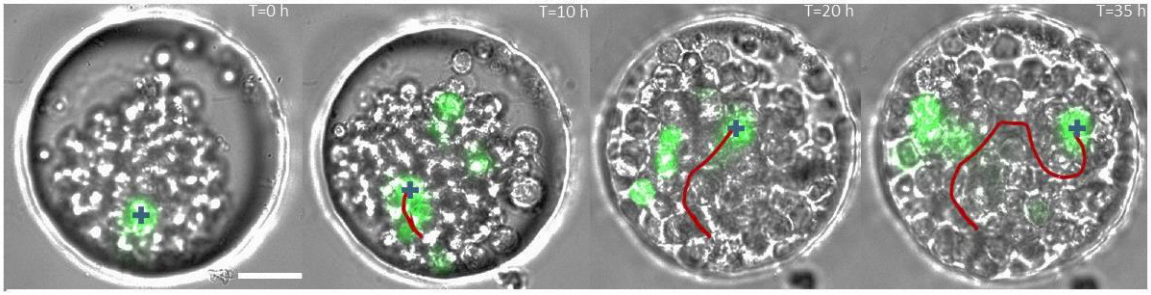


Figure 49 : Projection en 2D du suivi dynamique en 3D d'une cellule Zsgreen positive au sein d'un sphéroïde de N14. Une image en lumière blanche est fusionnée avec une image en épifluorescence, la cellule suivie par analyse d'image est repérée par la croix bleue. Echelle = 50 µm.

Sur les 48 heures d'acquisition, seules 6/22 des cellules marquées restent fluorescentes (réparties sur 4 puits), les autres s'éteignent à des temps variables et 3 apparaissent en cours d'acquisition pour deux sphéroïdes. Les cellules ZsGreen positives sont assez dynamiques et n'ont pas de localisation privilégiée au sein du sphéroïde : elles peuvent aussi bien se retrouver au centre du sphéroïde qu'à sa périphérie. La proximité de cellules nouvellement fluorescentes avec d'autres cellules positives pourrait laisser envisager qu'elles sont issues d'une division de ces dernières mais nos expériences n'ont pas permis de nous en assurer.

Ces différentes remarques sont à prendre avec précaution. Il serait intéressant de coupler ce suivi par vidéomicroscopie de l'activité du protéasome avec un marquage nucléaire ou de l'espace extracellulaire (exemple sulforodamine) pour les vérifier. Ceci permettrait par exemple de détecter le taux et le mode de division des cellules Zsgreen positives. En effet, les cellules souches cancéreuses sont décrites comme des cellules pouvant être originaires de divisions asymétriques mais aussi pouvant rentrer en quiescence. En flasque « classique » chez nos collaborateurs, des cellules ZsGreen négatives ont rapidement été retrouvées dans les flasques issus de la population triée ZsGreen positive.

Différentes analyses moléculaires ont été réalisées par l'équipe du docteur Gabut entre une population de cellules triées ZsGreen positives et une population non triée. Moins de 1% de la population non triée a été détectée positive. Aucune différence significative n'a été détectée pour un nombre important de marqueurs de différenciation ou de gènes. Ils ont conclu que ce rapporteur ne permet pas d'isoler un sous-groupe de cellules plus immatures au sein des sphéroïdes de N14 et ont stoppé son utilisation. En outre, les expériences présentées en Figure 48 et Figure 49 même si elles n'ont pas toutes menés à des analyses, en raison de problèmes techniques, ont été réalisées plusieurs

fois et ont montré des proportions variables des divers profils phénotypiques sans qu'aucune raison n'ait pu être mise en avant. Ceci complique donc l'interprétation du signal mais également la mise en place des expériences et leur reproductibilité. Il a donc été décidé de ne pas continuer l'analyse de ce marquage.

2.3. Immunomarquage

Les systèmes de micropuits représentent également une plateforme adaptée aux marquages cellulaires par immunofluorescence. Les étapes de fixation, incubation des marqueurs et visualisation par microscopie peuvent être effectuées directement au sein des puits. Dans ce cadre, j'ai pu co-encadré une stagiaire en L3 (Chloé Exbrayat) qui a utilisé les dispositifs d'agarose pour l'immunomarquage de sphéroïdes HCT116. Après quatre jours de culture, les agrégats sont fixés, l'actine et les noyaux sont marqués. L'acquisition d'image est effectuée par microscopie confocale.

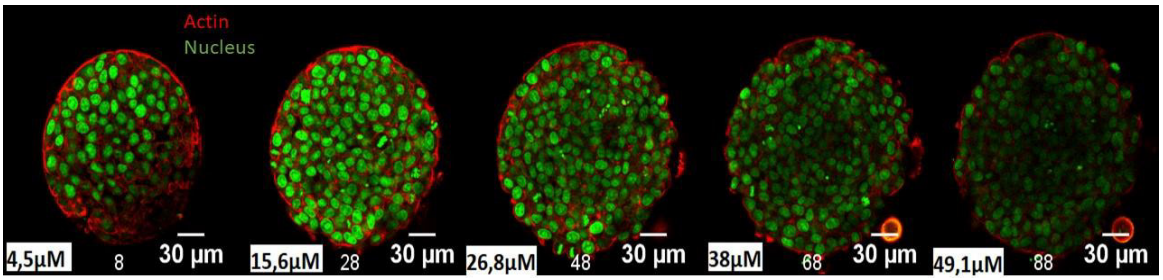


Figure 50 : Immunomarquages d'un sphéroïde HCT116. L'actine est marquée en rouge (Phalloïdine) et les noyaux en vert (Nucgreen). Différents z-stacks sont acquis par microscopie confocale à différentes profondeurs du sphéroïde.Echelle = 30 µm.

Pour des sphéroïdes de 200 µm de diamètre, il n'est pas possible de l'imager sur toute sa profondeur par microscopie optique. En raison de la faible profondeur de pénétration des photons les images sont inexploitables au-delà de 50 µm de profondeur. Des techniques de clarification se développent ces dernières années, elles permettent de contourner ce problème en homogénéisant les indices optiques, réduisant ainsi la diffusion[330]. Une méthode est maintenant utilisée en routine dans l'équipe, notamment par la doctorante Saba Goodarzi, en utilisant soit une solution commerciale (RapidClear), soit simplement une solution de glycérol.

2.4. Cellules isolées

Une évaluation largement utilisée dans l'étude du caractère souche des cellules cancéreuses est de tester leur capacité d'initier de manière clonale la formation d'un sphéroïde (sphere formation assay). Ce type de tests a été initialement utilisé pour l'authentification de cellules souches neurales[331] et fut ensuite largement repris dans le domaine de la cancérologie après l'apparition du concept de cellules souches cancéreuses et pour différents modèles biologiques (cancer du sein[332] du cerveau[191] du colon[333]).

L'essai se base sur un test de résistance à l'anoïkis qui désigne une forme spécifique d'apoptose due à un défaut d'adhésion à la matrice extracellulaire ou aux cellules voisines. Ce phénomène physiologique d'autodestruction est une barrière de défense contre une colonisation de cellules au mauvais endroit et est indispensable pour l'homéostasie tissulaire et le développement. Dans un contexte pathologique, une résistance à ce processus peut apparaître ; ceci parait indispensable par exemple dans le cadre tumoral et la création de métastases. Les cellules cancéreuses peuvent ainsi

survivre après le détachement de leur site primaire et migrer par l'intermédiaire du système vasculaire vers d'autres organes ou localisations[334].

Les systèmes d'agarose sont utilisés pour mettre en place ces tests de « sphere-forming assay ». Ceci permet tout d'abord d'avoir un système compatible avec la haute résolution mais aussi une solution à moyen débit rapide à mettre en place. Les premiers tests ont été effectués à l'aide des cellules HCT116 puis avec les cellules de GBM N14. Cette fois-ci, le diamètre des puits est réduit à 100 µm et la concentration cellulaire d'ensemencement est réduite. Le nombre de cellules par puits est contrôlé de manière statistique en fonction de la densité d'ensemencement et les puits présentant une cellule unique sont suivis par vidéo-microscopie.

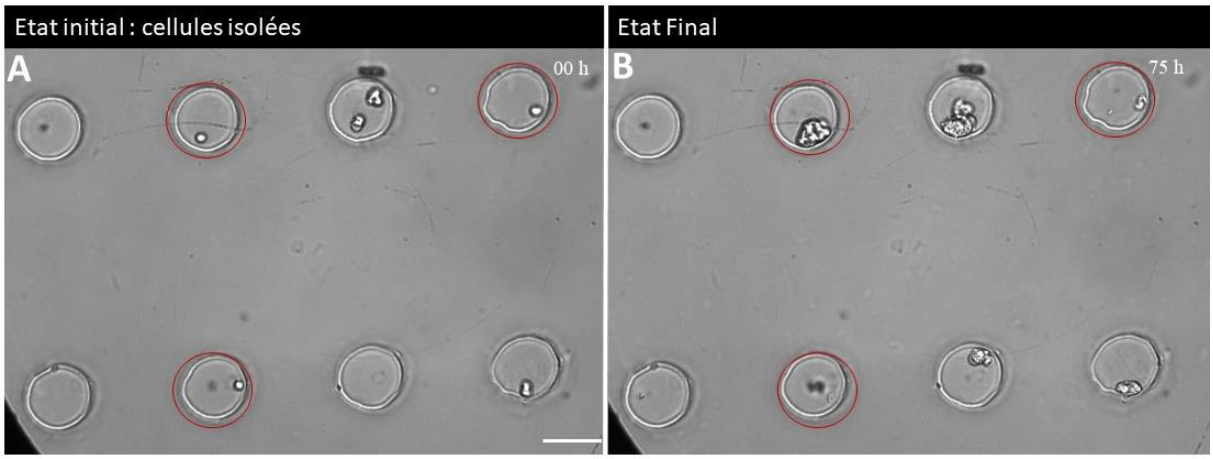


Figure 51 : Test de cellules isolées N14 dans des micropuits d'agarose standard Ø100 µm. (A) Etat initial : repérage des puits présentant une cellule isolée (B) Etat Final, après 175 h visualisation de la formation ou non d'un sphéroïde. Echelle = 100 µm.

Manuellement, nous vérifions pour chaque puits présentant une seule cellule, son état après quelques jours de culture. Nous obtenons ainsi en moyenne 20% des cellules N14 isolées qui initient au bout de quelques jours la formation d'un sphéroïde (trois expériences indépendantes pour une moyenne d'une centaine de cellules isolées). Cette proportion est stable et est retrouvée pour trois expériences indépendantes. A noter également qu'un test a été effectué avec des cellules comportant le rapporteur ZsGreen, des cellules ZsGreen négatives et positives sans discrimination. Les 2 types de cellules ont montré leur capacité à former des sphéroïdes.

Il est important de constater que plusieurs autres éléments n'ont pas été vérifiés ici. Tout d'abord, il serait nécessaire de coupler ces mesures avec un marquage nucléaire fluorescent afin de vérifier qu'une seule cellule est bien présente dans le puit au départ. Certains cas plus douteux ont été exclus de nos analyses. Dans certains cas, une seule division est apparue aux premières heures de suivi mais ne menant pas à d'autres divisions et à la formation de l'agrégat. Nous pouvons pour ce cas émettre une hypothèse : la division était engagée avant l'ensemencement et se poursuit au sein du puits. De plus, aucune distinction n'a été faite sur la taille ou l'aspect des sphéroïdes obtenus. Aucun consensus n'est établi sur le temps nécessaire à ce type de test, nous avons donc établi la durée d'acquisition de manières empiriques et là encore aucune distinction n'est faite sur la vitesse de croissance. De plus, il serait important de vérifier l'état des cellules qui n'ont pas initié de sphéroïdes. Un caractère spécifique des cellules immature réside dans leur capacité à se mettre en quiescence et à rester en phase G0. Il serait donc important de caractériser par des marqueurs de quiescence ou d'apoptose l'état des cellules classées dans cette catégorie. Enfin, les analyses ont été entièrement effectuées manuellement, il est alors essentiel de mettre en place une automatisation par analyse d'images pour

augmenter les statistiques. La thèse d'un doctorant en cours dans l'équipe est consacrée exclusivement à ce sujet maintenant (A. Chambost, 2ème année de thèse).

3. Croissances et contraintes

3.1. Croissance « libre »

A partir des courbes de croissance de N14 présentées précédemment et en effectuant la même analyse sur des sphéroïdes HCT116, nous avons voulu quantifier le mode de croissance des agrégats « libres » qui croissent dans du milieu de culture sans appliquer des contraintes extérieures. Deux modes de croissance simples sont possibles : une prolifération volumique c'est à dire que toutes les cellules constituant l'entité prolifèrent ou alors une croissance surfacique où seules les cellules en périphérie se divisent.

Pour le cas d'une croissance volumique nous avons $R(t) = R_0 e^{t\beta/3}$ avec β/3 = $\frac{\ln(2)}{T_d}$ et en croissance surfacique $R(t) = R_0 + \alpha e t$ avec e = épaisseur de la couche proliférative et α = $\frac{1}{T_d}$ ou T_d est le temps de division caractéristique des cellules utilisées.

Nous appliquons les deux modèles à nos courbes de croissance et nous obtenons alors par ajustement linéaire (en log linéaire pour le modèle volumique) Figure 53 :

N 14 : Volumique : T_d=92 h

HCT116 : Volumique : T_d= 33 h

Ce qui ne correspond pas à ce que nous observons en manipulation (Td en 2D pour les HCT116 = 24 heures, Td en 3D pour les N14 : 40 heures). Concernant, les HCT116 nous utilisons un temps obtenu en culture classique en 2 Dimensions, pour les N14 nous utilisons le temps de division obtenue par des expériences de « sphere forming assay » Figure 52.

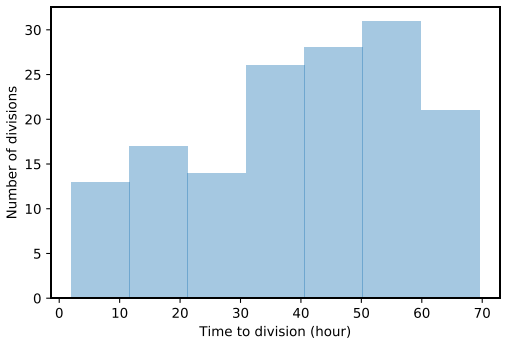


Figure 52 : Temps de division obtenu cellules N14. Les valeurs sont obtenues par l'analyse d'expériences de "spheres forming assay", méthode présentée en 2.4 Données acquises par A. Chambost N=150.

Pour appliquer un modèle surfacique nous calculons l'épaisseur de couche qui prolifèrent en utilisant des temps de division connus pour ces deux lignées nous avons alors :

N 14 : e= 0,1387*40/ln(2) = 8,5 µm

HCT116 : e=0,4283*24/ln(2)=15 µm

Ce qui correspondrait dans les deux cas à peine une couche de cellules.

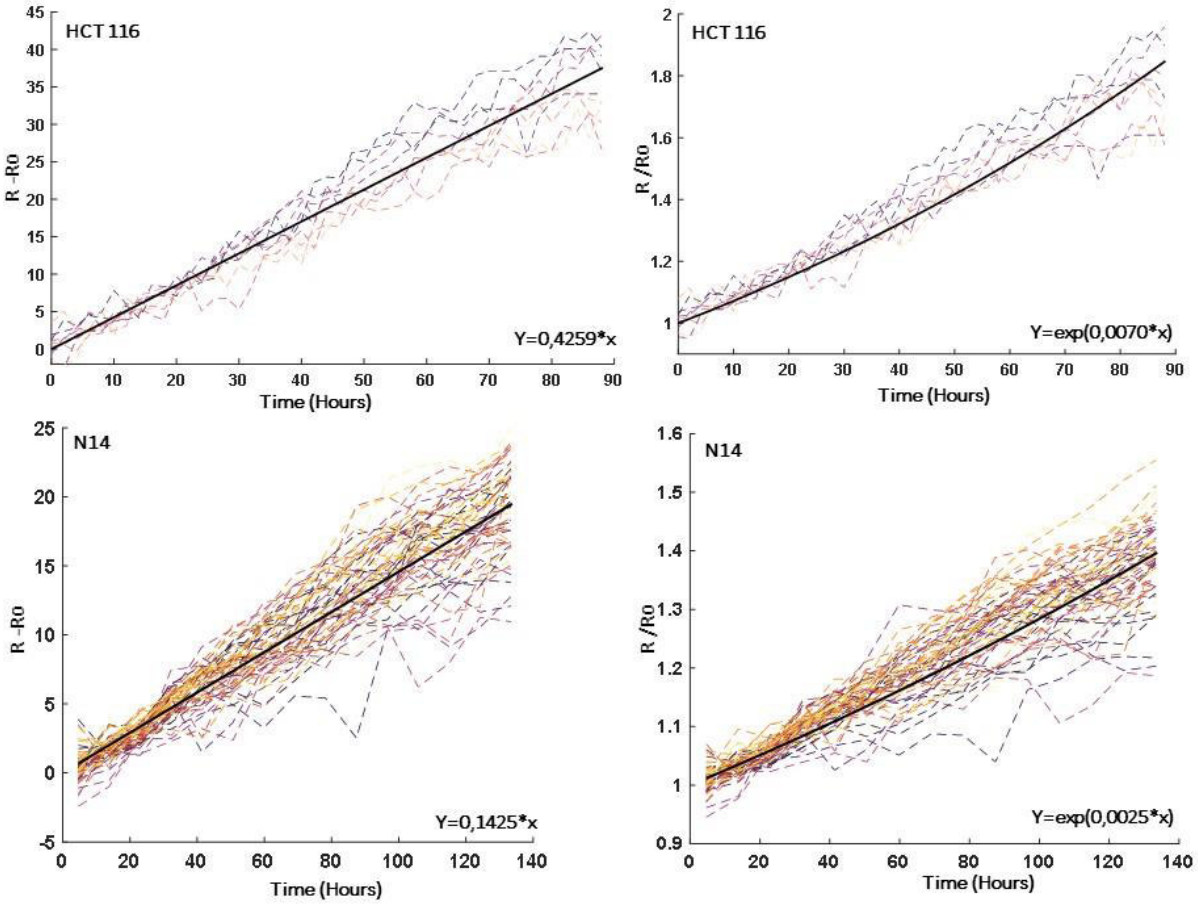


Figure 53 : Ajustement linéaire et exponentiel pour les deux lignées respectivement suivant le modèle surfacique (2 graphes de gauche en R-R0) et volumique (2 graphes de droite en R/R0). L'ajustement est effectué pour chaque courbe, la moyenne des ajustements est représentée par la courbe en noire.

Expérimentalement nous avons également utilisé le marquage EdU déjà utilisé dans le chapitre3. Le temps auquel l'EdU est ajouté est ajusté en fonction du temps de prolifération connu (pour

la lignée cellulaire N14 l'EdU est ajouté 72 h avant révélation, pour les HCT116 24 h avant). Les résultats sont donnés sur la Figure 54.

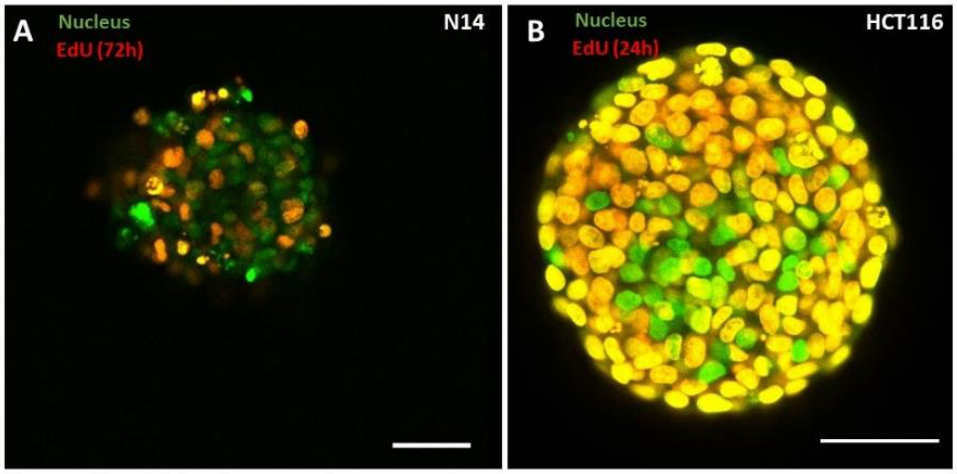


Figure 54 : Coupe transversale au milieu d'un sphéroïde de N14 (A) et d'un sphéroïde HCT116 (B) immunomarquage des noyaux en vert et EdU en rouge (ajouté 24 h avant révélation) échantillon transparisé. Les cellules Edu+/Nuc+ apparaissent en jaune Echelle = 50 µm

Dans les deux cas, la prolifération semble donc volumique, les cellules marquées EdU positives sont retrouvées au sein du sphéroïde.

3.2. Croissance sous contraintes de sphéroïdes HCT116 au sein des micropuits

Suivi de croissance sous contrainte :

Si les sphéroïdes sont ensuite laissés dans les systèmes de micropuits ils continuent à croître mais de manière non isotrope : ils ont une croissance en z (partie non contrainte) et peuvent dépasser la hauteur des puits (ici 200 µm). En x,y ils sont contraints par les bords des puits. Comme présenté dans le chapitre 2, il est possible d'ajuster la rigidité de l'hydrogel, les contraintes dues à la croissance peuvent donc être modulées.

Lorsque les micropuits sont réalisés en agarose standard à 2% (m/v), les sphéroïdes continuent à croître de manière longitudinale et ont alors une forme cylindrique. Un marquage en EdU (cellules en prolifération dans les dernières 24 h) et une clarification des échantillons (qui permet d'obtenir le signal sur la totalité du sphéroïde) permettent de montrer que seules les cellules en périphérie continuent à proliférer Figure 55.

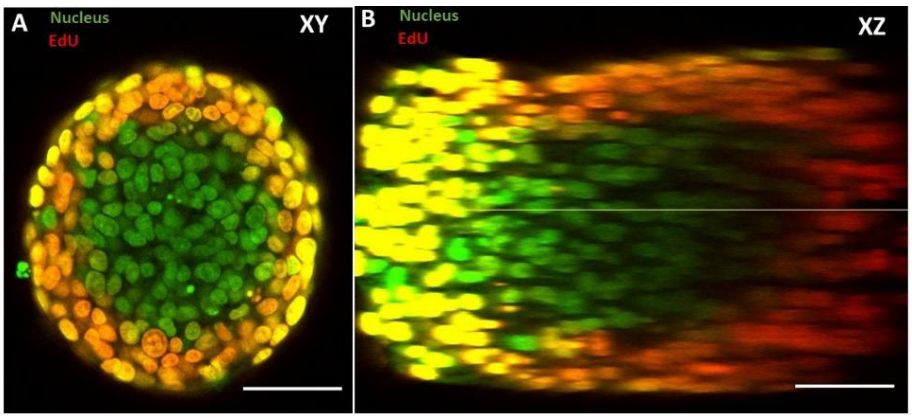


Figure 55 : Exemple d'un sphéroïde HCT116 contraint dans un micropuits d'agarose standard 2% (m/v), immunomarquage des noyaux en vert et EdU en rouge (ajouté 24 h avant révélation) échantillon transparisé. Les cellules Edu+/Nuc+ apparaissent en jaune (A) Coupe transversale au centre de l'agrégat. (B) Coupe longitudinale de l'échantillon.

Echelle = 50 µm, images prises en microscopie confocale 20x.

En utilisant une agarose Ultra Low gelling point à 2% (m/v), les sphéroïdes cette fois peuvent déformer les micropuits en continuant à proliférer. La courbe de prolifération ne montre pas de rupture brutale et le diamètre du sphéroïde continue d'augmenter même lorsqu'il excède 200 µm (Figure 56 A). Le marquage EdU montre toutefois que les cellules prolifératives se limitent aux deux premières couches externes lorsque l'agrégat présente un diamètre de 220 µm Figure 56 B.

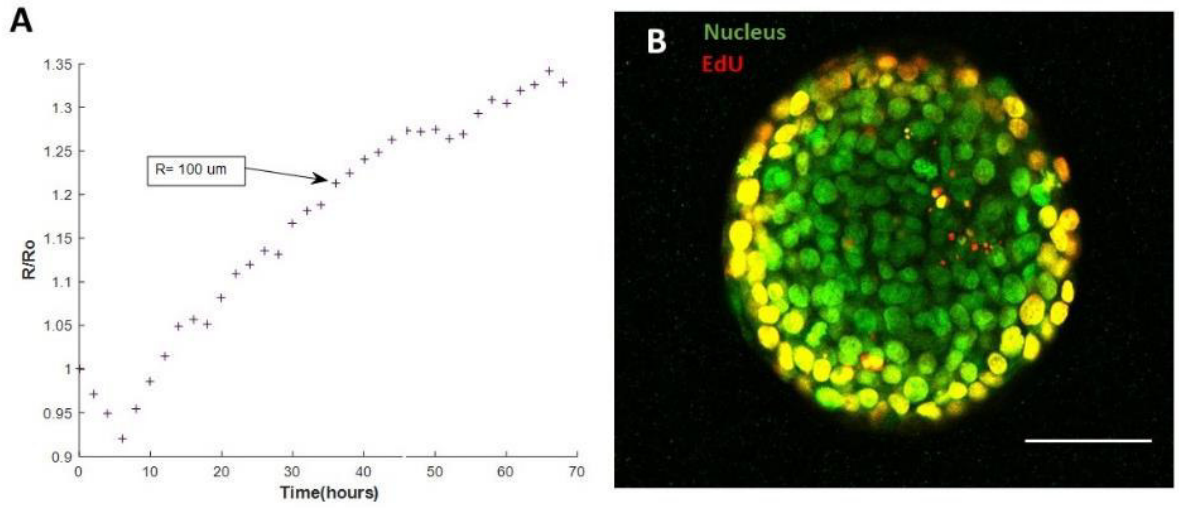


Figure 56 : Suivi de la croissance et prolifération d'un sphéroïde HCT 116 contraint dans des micropuits d'agarose Ultra Low Gelling Point 2% (m/v). (A) Suivi de prolifération d'un sphéroïde, lorsqu'il atteint un rayon de 100 µm il est contraint par les murs d'agarose. (B) Fixation et immunomarquage du sphéroïde contraint (diamètre de 220 µm) noyaux en vert (NucGreen)et EdU en rouge ajouté 24 h avant la fixation. Les cellules Edu+/Nuc+ apparaissent en jaune. Images obtenues par microscopie confocale en 20x à 27 µm de profondeur. Echelle = 100 µm.

Suivi des forces induites pendant la croissance sous contrainte par Traction Force Microscopie

Méthode

Il est également possible d'analyser les forces induites pendant la croissance du sphéroïde sous contrainte au cours du temps à l'aide de techniques de microscopie à force de traction (TFM, Traction Force Microscopy). Le principe de la TFM est de suivre la déformation d'un matériau et remonter aux forces à l'aide des lois physiques régissant son comportement. Cette technique a déjà été utilisée pour mesurer les forces imposées par des cellules uniques sur un substrat en 2D[335] puis des améliorations ont été développées afin d'augmenter le nombre de cellules analysées[339, 340] ou encore la résolution[338–340]. Des études ont également été mises en place pour des organismes entiers et étendues aux trois dimensions pour une cellule étalée sur un substrat[341], au sein d'une matrice extracellulaire[345, 346] ou pour des monocouches de cellules[344]. Parallèlement, des sondes élastiques déformables ont été développées pour accéder aux forces de compression internes à des agrégats[95, 345].

Dans ce but, des billes fluorescentes sont injectées dans le gel avant moulage des micropuits en agarose. Ces dernières vont permettre d'accéder à la déformation du substrat induit par les agrégats en croissance en suivant leur signal par vidéo-microscopie fluorescente. Les champs de déformations sont obtenus par analyses d'images et comparaison d'une image des signaux fluorescents à l'instant t avec une image de référence. Pour cela deux grandes catégories d'analyses se dégagent : les techniques de suivi de particules (single particle tracking SPT) qui se basent sur le suivi de particules individuelles dans un milieu et les méthodes de suivi de patterns (Particle Image Velocimetry PIV). La technique

développée par Hélène Delanoe-Ayari au sein de l'équipe appartient à la deuxième catégorie et se base sur une implémentation pyramidale et itérative de l'algorithme de Kanade–Lucas–Tomasi[346](KLT).

Commençons tout d'abord à nous intéresser brièvement à l'algorithme classique de suivi de KLT. Il se base sur trois paramètres : des petits déplacements (utilisation du développement de Taylor), la conservation de l'intensité lumineuse et un mouvement homogène pour un voisinage. Les éléments à suivre sont détectés sur l'image de référence à l'aide de la notion de maximum d'intensité locale (ils correspondent ici aux billes fluorescentes) et une fenêtre centrée sur chacun de ces derniers, est ensuite repérée. La fenêtre la plus comparable (maximum de vraisemblance) à cette dernière est ensuite recherchée sur la seconde image à l'instant t. Ceci est réalisé par une estimation au sens des moindres carrés en minimisant la fonction résiduelle suivante :

$$e(d_x, d_y) = \sum_{x=u_x-w_x}^{u_x+w_x} \sum_{y=u_y-w_y}^{u_y+w_y} (I(x,y) - J(x+d_x, y+d_y))^2$$

Avec I l'image de référence, J l'image à l'instant t, $U=(U_x,U_y)$ un point de l'image I et v=u+d ce même point sur l'image J et $w=(w_x, w_y)$ la fenêtre autour de celui-ci.

Deux améliorations sont ensuite ajoutées à cet algorithme : une implémentation pyramidale et un ajustement itératif. Ils permettent d'accéder à des déplacements plus importants et une résolution plus robuste qui permet d'appréhender des variances potentielles de luminosité et présence de bruits. Une pyramide est une succession de différentes versions de l'image Initiale présentant des résolutions réduites. L'algorithme est alors exécuté sur des images de plus en plus résolues avec la propagation des résultats du niveau supérieur jusqu'à l'image initiale. Le paramètre itératif quant à lui consiste à exécuter l'algorithme plusieurs fois pour chaque niveau de la pyramide en déplaçant l'image de l'instant t selon le dernier vecteur de déplacement obtenu. La solution doit alors finir par converger. Les points qui n'ont pas convergé sont exclus. Une résolution inférieure à la taille d'un pixel est acquise par une interpolation bilinéaire.

Cette méthode permet d'avoir accès à des phénomènes locaux tout en ayant un algorithme parallélisable (implémentable sur processeur GPU) robuste et assez précis pour nos types d'analyse.

Les paramètres à gérer sont les suivant :

-les propriétés expérimentales : taille et concentration des microsphères intégrées dans le gel et acquisition d'image (intervalle de temps, résolutions)

-les éléments d'analyses : les points à suivre, la hauteur de pyramides, le nombre d'itération et seuil, la taille de la fenêtre

Ils sont détaillés dans la partie matériels et méthodes en fin de manuscrit.

Résultat

En pratique, l'analyse est mise en place de la façon suivante. Une première étape est nécessaire pour recaler les images obtenues, pour cela l'algorithme est utilisé sur une partie au bord de l'image qui ne subit aucun déplacement. Les déplacements sont ensuite calculés pour une position en z. Un masque est créé à chaque temps afin de repérer la taille du sphéroïde et suivre seulement des points à l'extérieur de celui-ci. Les déplacements sont représentés sur la figure suivante en B. La norme des déplacements

est donnée pour chaque point à un temps donné puis la moyenne au cours du temps. Le temps de référence est pris lorsque le sphéroïde atteint la taille du micropuits.

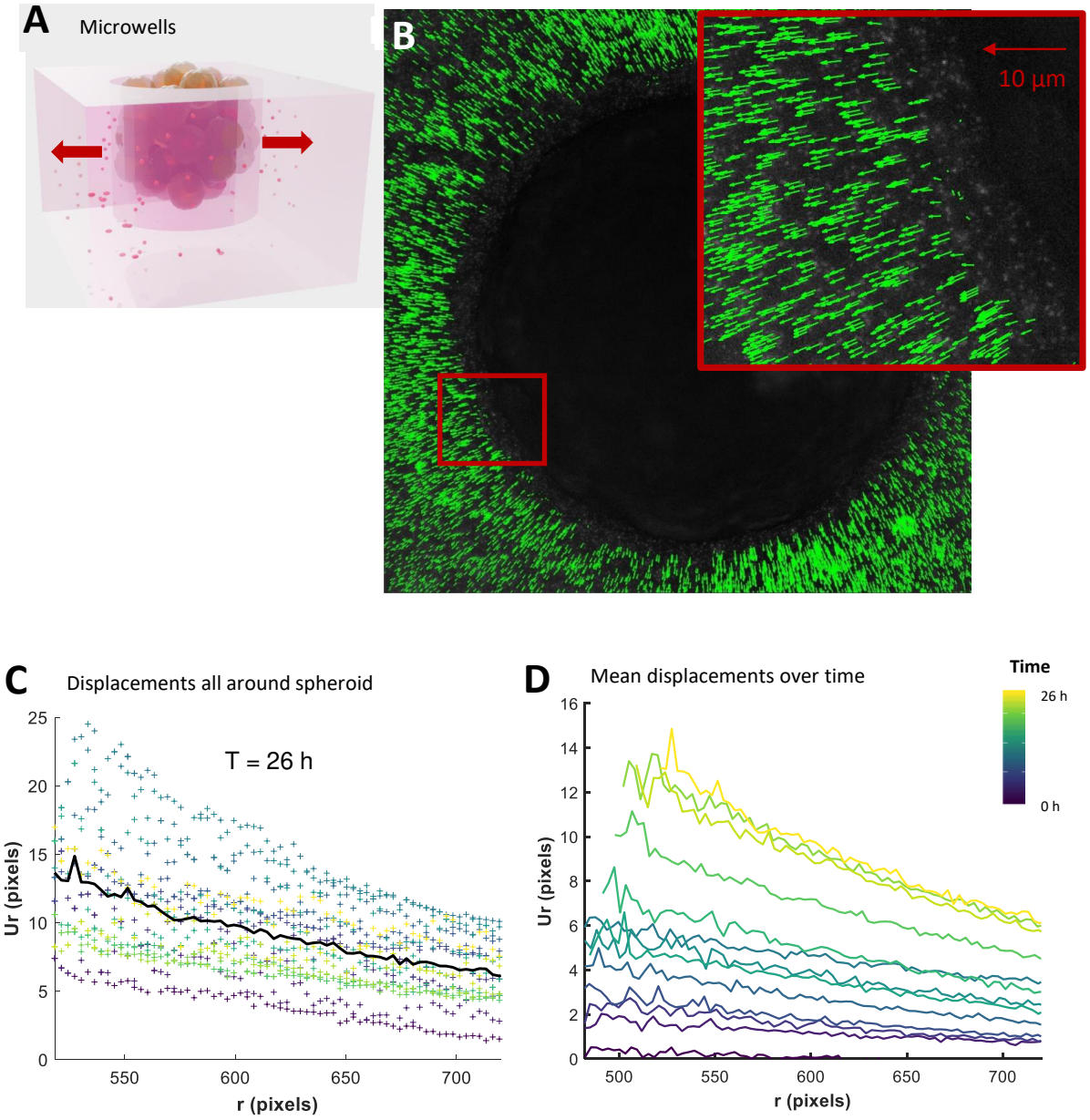


Figure 57 : Analyses des déplacements. (A) Représentation de la géométrie utilisée. (B) Champs de déplacements pout t=26 h (t=0 correspondant au moment où la taille du micropuits est atteinte). (C) U(r) : Déplacement pour t= 26 h, la moyenne est représentée en gras, chaque couleur correspond à un position angulaire différente autour du sphéroïde. (D) U(r) moyen en fonction du temps, chaque couleur correspond à un temps d'analyse de 0(bleu) à 26 h (jaune), intervalle de 2 h.

A partir de ces déplacements il est possible de remonter aux mesures des forces exercées par le sphéroïde durant sa croissance en appliquant les lois de la physique pour un matériau élastique (loi de Hooke).

En coordonnée cylindrique nous avons :

$$(1)\varepsilon_r = \frac{\partial u}{\partial r}\ (constant\ en\ bord)\ ; \varepsilon_\theta = \frac{u}{r} + \frac{1}{r}\frac{\partial v}{\partial \theta} \sim \frac{u}{r}; \varepsilon_z = \frac{\partial w}{\partial z}$$

$$(2)\ \varepsilon_r = \frac{1}{E}[\sigma_r - \nu\,(\sigma_\theta + \sigma_z)];\ \varepsilon_\theta = \frac{1}{E}[\sigma_\theta - \nu(\sigma_r + \sigma_z)];\ \varepsilon_z = \frac{1}{E}[\sigma_z - \nu(\sigma_r + \sigma_\theta)]$$

Une simulation à l'aide du logiciel Comsol (figure annexe 3) nous permet de savoir que $\sigma_\theta \sim 0$ et ε_r et ε_θ se retrouve facilement à l'aide des résultats précédents ; nous obtenons alors les valeurs de σ_r et σ_z suivant les relations (1) et (2).

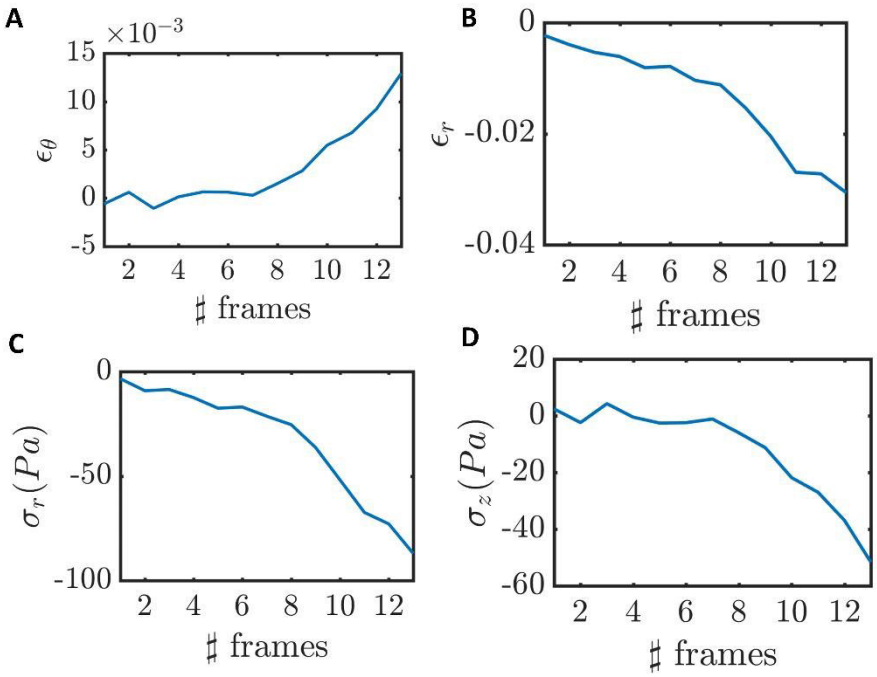


Figure 58 : Calcul des déformations et contraintes mécaniques. Visualisation des valeurs moyennes en fonction du temps. (A et B) déformation ε_θ et ε_r en fonction du temps. (C et D) Contraintes σ_r et σ_z en fonction du temps (l'intervalle entre chaque frame est de 2 h).

Cette technique nous permet donc de remonter à une analyse dynamique et quantitative des forces correspondant à une croissance de sphéroïde au sein d'agarose Ultra low gelling point. Ce type d'agarose ne permet pas de stopper la croissance et l'expansion du sphéroïdes d'HCT116. Nous n'arrivons pas à saturation sur les 26 h d'expérience. De manière surprenante, les forces observées sont locales : les déplacements ne sont pas homogènes en fonction de la position autour du sphéroïde Figure 57C. Ce phénomène peut être observé sur la vidéo de la croissance du sphéroïde HCT116 ici et celles avec le calcul des déplacements correspondant ici.

Avec cette géométrie en puits, il serait important d'accéder à un suivi en z si nous désirons aller plus loin car nous avons alors, comme observé avec l'agarose Standard, une croissance dans la partie non contrainte en suivant la forme des puits Figure 55. Nous avons donc décidé par la suite, d'utiliser une agarose plus rigide mais en incluant totalement les sphéroïdes dans l'agarose, pour imposer une contrainte isotrope.

3.3. Croissance sous contraintes isotropes : 1. Inclusion en agarose

Afin d'appliquer une contrainte isotrope autour des sphéroïdes, nous avons testé deux techniques présentées dans le premier chapitre 1 en 3.2. La Première consiste à inclure les sphéroïdes dans un gel d'agarose. Puisqu'ils croissent en taille, ces derniers vont déplacer l'hydrogel qui en retour va exercer des forces de compression tout autour de l'entité. Encore une fois, en ajustant la rigidité de l'agarose, la contrainte est modulée. Les sphéroïdes sont formés dans un premier temps à l'aide des systèmes de micropuits en agarose présentés dans cette partie. Douze heures après l'ensemencement, les cellules se sont agrégées et les sphéroïdes sont récupérés et inclut dans un gel d'agarose Low Melting point 0.5% m/v. De la même manière que précédemment, des billes fluorescentes sont ajoutées au gel et nous les suivons par analyse d'images. Pendant 36 h, des images sont prises en épifluorescence à intervalle régulier pour permettre de suivre les déplacements. Le temps de référence (t=0) correspond au moment où les sphéroïdes sont inclus dans l'hydrogel. Le relevé des déplacements est effectué pour un plan en z particulier.

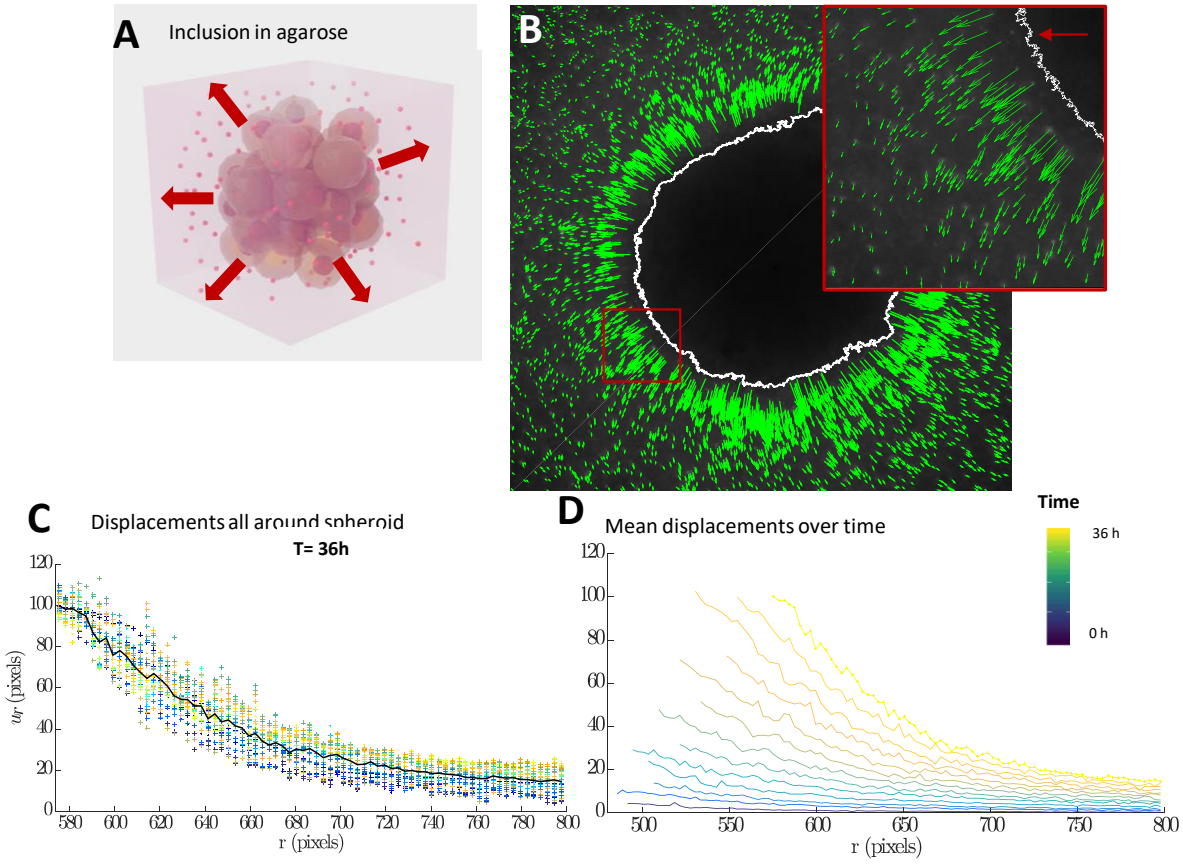


Figure 59 Analyses des déplacements. (A) Représentation de la géométrie utilisée. (B) Champs de déplacements pour t=36 h (t=0 correspondant au moment où le sphéroïde est inclus dans l'agarose). Echelle = 8 µm. (C) U(r) : Déplacement pour t= 36 h, la moyenne est représentée en gras, chaque couleur correspond à une position angulaire différente autour du sphéroïde (D) U(r) moyen en fonction du temps, chaque couleur correspond à un temps d'analyse de 0 (bleu) à 36h (jaune), intervalle de 2h.

D'après le Landau[347], en se plaçant en coordonnée sphérique et pour un matériau élastique, nous avons : $grad\big(div(u)\big) = 0$ et $u = ar + \frac{b}{r^2}$. Or ce n'est pas ce que nous observons sur nos vecteurs de déplacement : $u_r(r)$ présente une forme mieux ajustée par une exponentielle Figure 60.

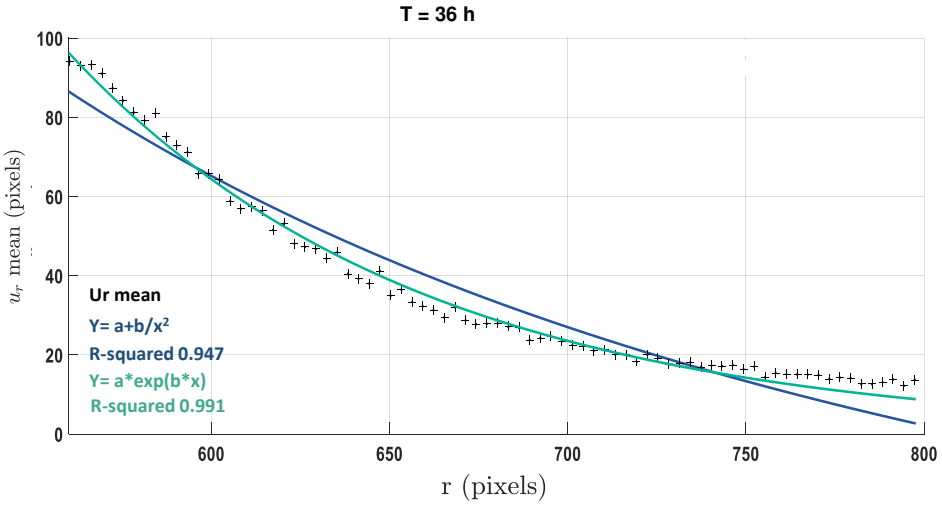


Figure 60 : Visualisation du déplacement moyen à t=26 h. Moyenne des points expérimentaux en noir. Courbe bleue : ajustement en 1/r² en bleu. Courbe verte : ajustement par une exponentielle. La même observation a été faite pour chaque temps d'expérience.

Il apparait clairement sur nos champs de déplacement Figure 59B que nous obtenons une longueur caractéristique des déplacements. Ceci se retrouve également sur l'ajustement exponentiel des déplacements, qui donne pour chaque temps le même ordre de grandeur pour la longueur caractéristique. L'existence de cette longueur caractéristique pour les déplacements est incohérente avec un modèle purement élastique. Le comportement de l'agarose n'est donc plus élastique pour des déformations plus importantes. Il n'est donc pas possible de remonter aux forces exercées pas le sphéroïde avec des lois simples d'élasticité dans ce cas. La relation entre la contrainte imposée et la déformation de l'agarose présente alors une relation non linéaire plus complexe.

Outre le calcul des déplacements, des suivis de croissance à long terme sont également effectués en lumière blanche.

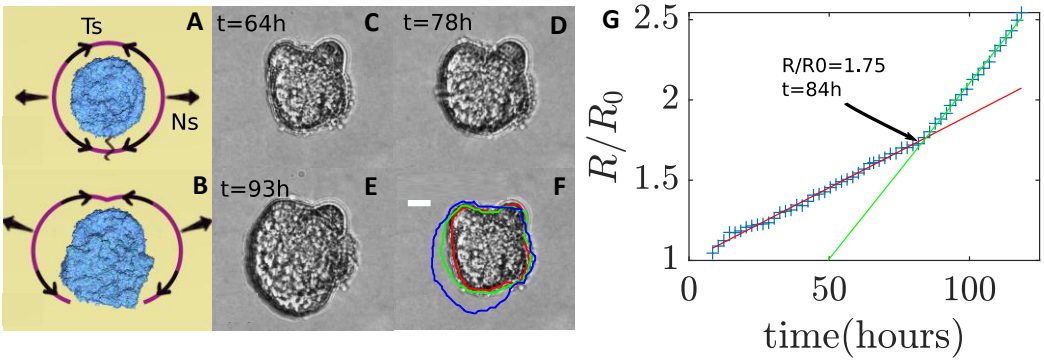


Figure 61 : Prolifération des sphéroïdes HCT116 dans une matrice d'agarose Low-Melting point 0,5% (m/v). (A) La croissance des sphéroïdes induit des forces de tension Ts et normales Ns. (B) ceci peut éventuellement induire pour des déformations importantes à une rupture du gel. (C-E) Exemple d'une telle rupture (F) Superposition du contour du sphéroïde au cours du temps en rouge, vert et bleu respectivement C, D et E. Images acquises en contraste de phase 20x, échelle = 200 µm. (G) Courbe de suivi de prolifération par analyse automatique du rayon de l'agrégat. Une rupture de la courbe apparait à 75 % de déformation, correspondant certainement à une rupture du gel. Cette figure apparait dans l'article en soumission et disponible sous biorxiv [245].

Lors de la croissance de l'agrégat dans le gel, des forces tensiles (Ts) et normales (Ns) sont induites par l'expansion, Figure 61A. A 75% de déformation, une rupture est visible sur la courbe de prolifération à t=84 h, correspondant certainement à une rupture de l'agarose, Figure 61B,G. Ces résultats ainsi que les résultats de caractérisation rhéologiques de l'agarose ont servi pour une étude collaborative (en cours de soumission et disponible sous biorxiv[245]).

De plus, il apparaît que certains sphéroïdes ne présentent plus du tout une forme sphérique après croissance dans l'agarose, certains ont une forme d'ovoïde très particulière. Les deux géométries observées sont représentées dans la figure suivante, après fixation et immunomarquage.

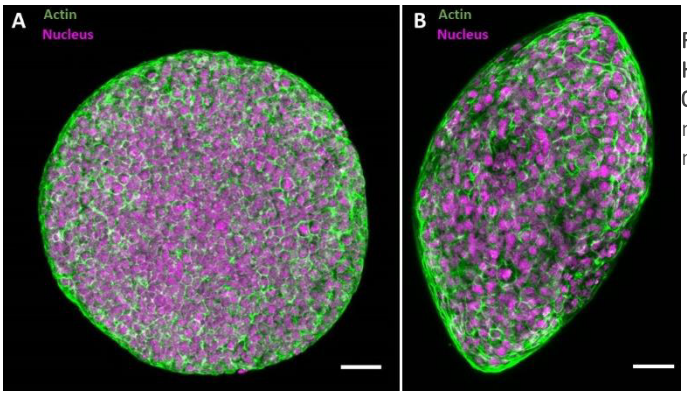


Figure 62 : Immunomarquage des sphéroïdes de HCT116 inclus dans un agarose Low melting point 0,5% (m/v), fixation et marquage actine verte et noyau magenta. Projection maximale en z images prises en microscopie confocale 20x Echelle =50 µm

Il semblerait alors que cette forme en ballon de rugby Figure 62B soit due à des cracks du gel lors de la croissance de l'agrégat, les sphéroïdes se relâchent alors dans ces cassures et continuent de s'étendre sous cette morphologie particulière.

3.4. Croissance sous contraintes isotropes : 2. Pression osmotique

Une autre technique originale employée précédemment par Dr Monnier Sylvain et son ancienne équipe de l'Institut Curie est de supplémenter le milieu de culture par un polymère biocompatible : le Dextran[348, 95]. Ce dernier n'est pas internalisé par les cellules et n'infiltre par l'espace extracellulaire des sphéroïdes ; il permet alors d'appliquer une pression osmotique constante autour du sphéroïde. La relation entre sa concentration et la pression osmotique a été précédemment calibrée. Cette approche est compatible avec le système de micropuits : le dextran est simplement ajouté au milieu de culture dans les puits et la pression osmotique est alors appliquée à la centaine de sphéroïdes présents.

Trois différentes conditions sont testées en parallèle :

-la condition « contrôle » : les sphéroïdes sont gardés en culture dans du milieu « classique souche » sans sérum et avec facteur de croissance

-la condition « différenciée » : après trois jours de culture en milieu « différencié », les sphéroïdes sont laissés quatre jours en milieu « souche » sans sérum et avec facteur de croissance

-la condition « pression » : après trois jours de culture en milieu « différencié », les sphéroïdes sont laissés quatre jours en milieu « souche » complémenté avec du Dextran 6 kDa à une pression de 5 kPa.

Au vu de la difficulté d'interprétation du marquage fluorescent Zsgreen pour caractériser un état immature des cellules de GBM au sein de sphéroïde, il a été décidé pour cette série d'expériences d'utiliser la combinaison de différents immunomarquages cellulaires largement utilisés dans la littérature, afin d'évaluer l'effet des contraintes mécaniques sur l'état des cellules de GBM au sein de sphéroïdes.

In fine, le marqueur nucléaire Nucgreen et le marqueur Olig 2 sont ensuite observés par immunofluorescence et microscopie confocale. Olig 2 est un facteur de transcription qui est souvent décrit comme « marqueur souche » dans la littérature, il présenterait un rôle dans la dédiférentiation des cellules de GBM.

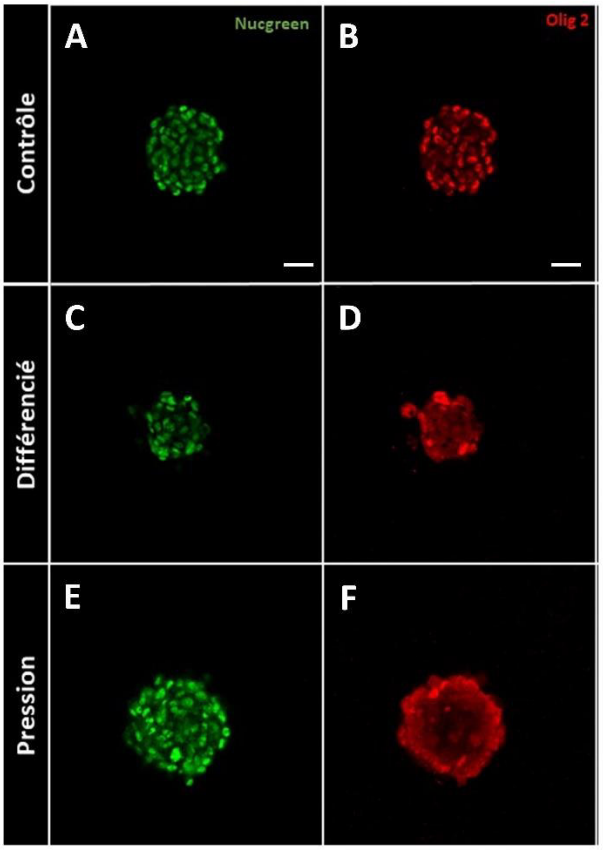


Figure 63 : Immunomarquage des sphéroïdes N14. NucGreen (vert) Olig 2 (rouge). (A), (B), Contrôle :7 jours de culture en milieu souche. (C) et (D) Différenciation (3 jours en milieu « différencié » et 4 jours en milieu « souche »). (E), (F), Pression : 3 jours milieu souches et 4 jours avec du Dextran 6kDa à 5kPa. Echelle = 50 µm. Images acquises par M. Carcel.

En condition contrôle Figure 63A, B, Olig 2 présente une colocalisation avec le marqueur nucléaire Nucgreen, ce qui suggère un état immature des cellules qui ne se retrouve pas en état différencié ou il est exclu comme attendu. Sous pression Figure 63E-F, les sphéroïdes présentent tout d'abord un phénotype plus rond et une taille plus importante en comparaison à l'état différencié Figure 63C-D. De plus, Olig 2 semble présenter une localisation plus nucléaire en périphérie qu'au centre du sphéroïde ce qui suggère un effet de la pression sur « l'état » des cellules au sein du sphéroïde. Peu de résultats ont été obtenus au cours de la thèse sur cet aspect mais le projet est actuellement repris par une doctorante arrivée en octobre et va permettre de progresser dans cette direction.

Discussion :

Intérêt du microsystème en agarose développé

Le but de cette section était l'optimisation d'un système de production et d'analyse de sphéroïdes. Ces agrégats multicellulaires sont de plus en plus utilisés et présentent un intermédiaire intéressant entre la technique plus classique de culture cellulaire en 2D et le modèle animal. Ils apportent une complexité supplémentaire en ajoutant notamment l'interaction cellules-cellules en 3D et l'auto-organisation. Le dispositif imaginé (brevet FR 1870349) est composé d'un réseau de micropuits d'agarose en adhésion sur une lamelle de verre. Ils permettent une production à moyen débit de sphéroïdes de taille homogène et ceci relativement rapidement (un seul pipetage plus d'une centaine de sphéroïdes de Ø200 µm par exemple). L'utilisation de l'agarose comme substrat présente, comme détaillé dans le chapitre 2, des avantages importants par rapport aux matériaux généralement utilisés pour les dispositifs microfluidiques. Il permet d'acquérir un environnement à rigidité et diffusion physiologique, compatible avec la culture cellulaire à long terme et le criblage thérapeutique. De plus, c'est un matériau naturel sur lequel les cellules n'adhérent pas, il ne nécessite donc pas de traitement chimique, seulement une stérilisation par rayonnements UV avant l'ensemencement.

Suivi de la croissance des sphéroïdes sous environnement contrôlé

Différentes applications de ce dispositif ont pu être testées au cours de cette thèse en utilisant deux modèles biologiques distincts : le cancer colorectal et le glioblastome. Son intégration sur lamelle de verre pré-traitée APTS apporte une compatibilité avec la vidéo-microscopie et microscopie à haute résolution. La formation et la croissance de sphéroïdes ont pu être suivies de manière individuelle, ce qui permet tout d'abord de s'affranchir des phénomènes possibles de fusion et laisse la possibilité de détecter des comportements atypiques tout en ayant un nombre relativement important de sphéroïdes en parallèle. Après implémentation d'analyse automatique d'images, plusieurs dizaines de sphéroïdes peuvent être étudiés en parallèle et ce nombre peut être facilement augmenté. Ceci permet facilement de comparer différentes conditions. En effet, les données présentées ici sont issues d'un seul puits avec à l'intérieur un seul réseau de micropuits ; en utilisant une plaque classique complète de 24 puits, cette statistique peut donc être facilement augmentée.

Compatibilité des micropuits avec l'immunomarquage

Différents types d'analyses *in fine* sont également possibles : le microsystème fournit une plateforme conviviale pour l'immunomarquage. Les différentes étapes (fixation, perméabilisation, blocage, incubation d'anticorps) puis la visualisation par microscopie, s'effectuent directement *in situ*. De plus, des techniques de biologie moléculaire (PCR, Western Blott) sont également envisageables : pour cela, les sphéroïdes doivent cette fois être extraits des micropuits ce qui est possible par action mécanique par pipetage répété. Il est également possible de réaliser des systèmes « flottants » sans adhésion sur une lamelle de verre mais simplement déposé dans une plaque de culture classique (24 puits). Il est alors possible de les retourner et après sédimentation d'une trentaine de minutes, les sphéroïdes quittent les puits et il est alors possible de les récupérer.

Suivi de cellules fluorescentes au sein de sphéroïdes

Le suivi individuel de cellules particulières au sein de sphéroïde a pu être mis en place. Même si le marquage fluorescent de l'activité du protéasome par le marqueur ZsGreen s'est révélé décevant

dans le contexte du glioblastome, ce type de méthode peut être appliqué pour d'autres rapporteurs. Un autre identificateur fonctionnel est utilisé dans ce même contexte des cellules souches cancéreuses : le rapporteur d'activité enzymatique de l'ALDH (aldéhyde déshydrogénase). Cette dernière possède notamment un rôle dans le métabolisme de l'acide rétinoïque et dans la différenciation cellulaire. La discrimination de certaines cellules par mesure de cette activité a déjà montré des résultats dans le cadre de cancer du sein. Ce type d'identification dynamique présente une option intéressante dans le contexte des cellules souches cancéreuses qui semblent présenter une plasticité importante. Le traçage de cellules fluorescentes peut également être appliqué sur des systèmes plus complexes : des marquages multicolores « rainbow » identifient particulièrement chaque cellule par un fluorochrome différent qui est ensuite transmis à leur descendance[349]. Ce type de linéage cellulaire a été imaginé pour l'indentification de neurones mais peut être appliqué sur d'autres modèles et pourrait par exemple permettre de détecter la prévalence ou non de différents clônes au sein de l'agrégat ce qui pourrait être très intéressant notamment pour des modèles aussi hétérogènes que le GBM. Cette technique est actuellement utilisée au sein de l'équipe biophysique pour les modèles de GBM avec notamment la mise en place de lignées-GFP de marqueurs souches (Olig2 et ELV4) démarrés par M. Mouelhi dans le cadre de sa thèse.

« Sphere forming assay »

Une utilisation également intéressante des systèmes est la mise en place de « sphere forming assays » qui permettent de caractériser différentes sous-populations cellulaires par leur capacité à initier la formation d'un agrégat de manière clonale en résistant à l'anoikis. Il constitue un intermédiaire *in vitro* au test de tumoriginicité *in vivo* par xénogreffe plus compliqué à mettre en place. Peu de techniques développées pour la formation de sphéroïdes permettent de le faire de manière clonale ; seule la méthode de gouttes pendantes pourrait éventuellement permettre d'isoler une cellule unique, mais il serait ensuite difficile de renouveler le milieu de culture pour chaque goutte et cela ne pourrait pas être compatible à de la culture à long terme. Traditionnellement, sa mise en place repose sur un ensemencement à faible densité de cellules dans un environnement ne permettant pas leur adhérence (flasque ULA ou polyHema). Ce type de test a été validé par la mise en avant de sous-populations présentant une hausse de marqueurs connus pour être synonyme d'immaturité[336, 355]. Cependant, bien qu'ensemencé à faible densité, la clonicité des sphéroïdes ainsi formés n'est pas rigoureusement contrôlée, l'agrégation cellulaire ou fusion de sphères peut se produire. Nous avons notamment pu constater que les sphéroïdes de N14 sont très dynamiques, un regroupement au centre de la flasque peut donc rapidement se mettre en place. Une véritable clonicité ne peut être garantie que par l'ensemencement d'une cellule seule par puits. Ceci peut être mis en place dans des plaques 96 puits à faible adhésion mais l'ensemencement est compliqué à contrôler et très chronophage. Quelques systèmes microfluidiques en PDMS ont été récemment imaginés afin de piéger et d'isoler les cellules de manière indépendante[351, 352]. Ils permettent de s'affranchir des problèmes d'agrégation tout en gardant une solution proposant une assez bonne statistique et rapide à mettre en place mais l'environnement est encore une fois le PDMS.

Nos microsystèmes en agarose apparaissent donc encore une fois comme une solution très intéressante pour répondre à ce genre de problématique. Il est ainsi tout d'abord possible de quantifier la proportion de cellules capables de former des sphéroïdes, ce caractère permet d'identifier deux sous-groupes distincts dans la population des cellules de GBM : seuls 20% d'entre elles sont capables d'initier

la formation de sphéroïdes. Des études concernant les cellules souches neurales suggèrent que des cellules progénitrices seraient également capables d'induire des sphères[353, 354]. Il serait donc probablement nécessaire d'ajouter des analyses a posteriori de marqueurs d'immaturité ou de voir si des sous-groupes peuvent être distingués en comparant par exemple les taux de prolifération ou bien encore l'aspect des agrégats obtenus *in fine*. Il est ensuite envisageable d'étudier le potentiel impact de drogues ou gène spécifique (utilisation SiRNA, shut down) ou même pourquoi pas de pression osmotique sur cette proportion. De plus, au vu de l'actuel échec de caractérisation d'une sous population de cellules souches de manière moléculaire il pourrait être intéressant d'envisager une approche inverse pour identifier et caractériser l'activité des cellules CSG en partant d'un phénotype observé pour identifier une signature moléculaire précise. Une première identification fonctionnelle d'une sous-population de cellules résistantes à l'anoikis permettrait de définir une signature moléculaire des sous-groupes non pas à l'échelle de sphéroïdes hétérogènes mais sur des cellules uniques ou du moins sur des sphéroïdes venant de se former.

La distinction par propriétés fonctionnelles présente des avantages évidents par rapport aux marqueurs dynamiques qui peuvent notamment dépendre de la phase du cycle cellulaire. Outre l'état de cellules souches cancéreuses encore difficile à appréhender, cette méthode permet de distinguer différentes sous-populations de cellules, ce qui peut s'avérer très intéressant pour des populations aussi hétérogènes que les cellules de glioblastomes. Au-delà des études statistiques, des analyses par vidéo-microscopie de marqueurs fluorescents peuvent être facilement mises en place grâce à la compatibilité des systèmes avec la microscopie haute résolution mais également des observations *a posteriori* d'immunofluorescence ou de biologie moléculaire. Pour ce dernier cas, il est alors nécessaire d'extraire les sphéroïdes précisément des puits voulus. Pour cela, des tests préliminaires ont été effectués pour l'utilisation d'un micromanipulateur. Il est tout à fait possible de prélever de manière précise des sphéroïdes tout juste formés. Malheureusement, dans le temps imparti par la thèse il n'a pas été possible d'aller plus loin dans les analyses. Cependant, un doctorant (A. Chambost) est arrivé en 2018 afin de se consacrer uniquement à un projet dédié à cet aspect. C'est une collaboration entre l'équipe de biophysique et l'équipe du Docteur Gabut (CRCL). Après prélèvements, on utilisera les récentes innovations technologiques qui permettent de séquencer de faibles quantités de cellules, voir même des cellules uniques.

Croissance et effet des contraintes mécaniques

Les analyses de croissance des sphéroïdes de N14 et HCT116 mettent en avant les limites des modèles trop simples utilisés pour ajuster les résultats. Deux approximations majeures sont faites. : le temps de division cellulaire est considéré comme uniforme pour toutes les cellules constituants les sphéroïdes. Ceci n'est probablement pas le cas particulièrement pour les cellules N14 qui sont définies comme une population assez hétérogène, les analyses obtenues par les expériences de « sphere forming assay » montrent une distribution non uniforme du temps de division. De plus, ici la densité cellulaire est considérée constante ; or la taille des cellules peut probablement varier au sein du sphéroïde et au cours du temps. Il serait intéressant de vérifier ces aspects avec notamment une analyse de la taille des cellules par analyse d'images et marquage de l'espace intercellulaire et des temps de division par marquage Fucci.

Des tests ont ensuite également été mis en place pour analyser l'effet des contraintes mécaniques sur ces sphéroïdes. Différentes approches ont été testées : laisser croître les sphéroïdes dans les micropuits de différentes rigidités, par inclusion dans de l'agarose ou par pression osmotique.

L'analyse des forces induites par microscopie à force de traction a permis de montrer que les contraintes exercées sont locales. Il pourrait être intéressant de regarder si c'est toujours le cas pour d'autres types cellulaires plus cohésifs par exemple. Nous avons également pu observer que la contrainte imposée par ce type d'agarose ne suffit pas à stopper la croissance cellulaire, les sphéroïdes continuent de croître et aucune saturation n'est observée sur le temps d'analyse. Les contraintes sont ici bien inférieures à celles souvent utilisées dans les expériences montrant une baisse de prolifération sous pression osmotique[91, 91] (centaine de Pa versus kPa). Il serait cependant intéressant de confronter les suivis de prolifération avec des mesures de croissance « libre » de sphéroïdes de même taille. Même si aucune rupture de pente n'a été observée ; un ralentissement de l'expansion pourrait être envisagé, les marquages EdU montrant une prolifération uniquement périphérique. Il nous manque cependant des analyses complémentaires pour interpréter correctement ces expériences. Il serait tout d'abord important d'effectuer le même marquage EdU et suivi de prolifération sur un sphéroïde non contraint mais présentant le même diamètre et ainsi comprendre si cette distribution périphérique des cellules prolifératives est à imputer à la taille du sphéroïde ou à sa contrainte dans les puits d'agarose Ultra Low Gelling Point. Comme présenté dans la littérature[89], nous observons que la contrainte dans des puits plus rigides, induit une prolifération longitudinale et seules les cellules en périphérie semblent encore se diviser. Ensuite, les analyse en inclusion dans l'agarose Low Gelling point ont permis de montrer que tout d'abord l'agarose n'a pas un comportement linéaire élastique à plus fortes déformations et qu'ensuite à très fortes déformations des phénomènes de rupture peuvent apparaitre et relâcher les contraintes imposer aux cellules au sein des agrégats. Il est donc important de prendre des précautions pour ce genre de test.

Ce travail de caractérisation rhéologique de l'agarose, ainsi que la mise en évidence du phénomène de fracture de l'agarose à forte déformation ont été inclus dans un travail collaboratif analysant le rôle des contraintes mécaniques dans l'efficacité des traitements pour des modèles cellulaires de cancer du pancréas[245].

Enfin, des contraintes ont été appliquées par pression osmotique sur des sphéroïdes de glioblastome peu de résultats ont pu être obtenus sur cet aspect dans le temps imparti par cette thèse mais il semble très important de creuser cet axe car l'effet des contraintes mécaniques est très peu étudié dans le cadre du glioblastome et les prémices du projet nous laissent envisager un impact de la pression sur l'état souches des cellules cancéreuses par une relocalisation du marqueur olig2 sous pression. Ici, l'approche utilisée est d'abord de différentier les cellules de glioblastome puis de voir un potentiel effet des contraintes sur un phénomène de dédifférenciation. Ces éléments seront également poursuivis dans le cadre de la thèse de M. Mouheli.

Conclusion générale

La majorité du travail présenté dans ce manuscrit a donc été le développement de deux microsystèmes : l'un permettant d'étudier l'impact de contraintes mécaniques prolongées sur une population cellulaire en 2D et l'autre permettant la production et l'analyse de sphéroïdes à moyen débit. Les résultats obtenus constituent les premiers résultats de deux collaborations entre l'équipe biophysique de l'ILM et deux équipes du CRCL. La mise au point du système de confinement en 2D fait l'objet d'un article en cours de soumission[355]. La mise au point des micropuits pour analyser les cellules en 3D a fait l'objet d'un brevet (FR 1870349). Enfin, la caractérisation rhéologique de l'agarose avec la mise en évidence d'un comportement élastique aux faibles déformations (inférieur à 10%), mais plus complexe pour des déformations importantes, a été utilisé pour estimer la contrainte imposée au cours de la croissance de sphéroïdes dans un travail collaboratif en cours de soumission[245].

Le système de confinement cellulaire est maintenant abouti et validé pour plusieurs types cellulaires et ce à long terme. Il permet d'envisager plusieurs types d'analyses dynamiques ou post confinement. Des paramètres peuvent aussi être rajoutés pour des études multiparamétriques : co-culture ou ajouts de molécules thérapeutiques par exemple. Il continue à être utilisé au sein de notre équipe par M. Mouelhi sur des cellules colorectales mais également dans l'équipe du Dr V. Maguer-Satta sur les cellules leucémiques et mammaires.

La collaboration avec l'équipe du Dr M. Gabut continue également au-delà de ma thèse avec les thèses en cours d'A. Chambost sur la partie cellule unique et M. Mouelhi sur la partie effet des contraintes mécaniques. Ce projet de thèse a permis de tester un spectre important d'applications du dispositif de micropuits d'agarose ; ce qui a permis d'initier plusieurs projets actuellement poursuivis dans l'équipe. Le modèle biologique utilisé est complexe, les cellules utilisées sont primaires et le glioblastome est un type de cancer difficile à appréhender par son importante hétérogénéité inter et intra tumorale. Cependant il est essentiel de progresser dans sa compréhension car il demeure actuellement un cancer létal avec 100 % de récidive retrouvé.

La microfluidique permet de répondre de plus en plus au besoin de complexification des modèles d'études utilisés en cancérologie. Cependant il n'est pas toujours aisé de développer des systèmes efficaces tout en gardant des conditions physiologiques et ne pas induire des changements de l'environnement non contrôlés (gradients de nutriments, pH …) surtout au-delà de 1 ou 2 heures. L'utilisation de l'agarose présente de nombreux avantages pour la culture cellulaire et son utilisation émerge dans ce domaine de la microfluidique. En revanche, s'il présente des propriétés élastiques à faibles déformations, nos études en Traction Force Microscopy ont montré un comportement bien plus complexe pour des déformations plus importantes. De plus, un phénomène de rupture apparait à très fortes déformations. Il n'est alors pas simple de connaître les réelles forces de compression appliquées lors de l'inclusion de sphéroïde en croissance dans cet hydrogel.

Il est maintenant avéré que les propriétés cellulaires dépendent des contraintes locales du tissu et que ces dernières participent au remodelage dans le contexte tumoral. Les propriétés mécaniques ont une influence sur les propriétés individuelles sur les cellules mais aussi sur le comportement collectif à l'échelle du tissu. Il est évidemment intéressant de regarder l'impact des contraintes sur les cellules cancéreuses mais également sur les cellules du stroma car elles aussi subissent des variations importantes. Quel que soit le niveau des forces de contraintes appliquées, la méthode utilisée et la lignée cellulaire, nous retrouvons une baisse de la prolifération sous contrainte.

L'étude des cellules souches cancéreuses est assez difficile à aborder. Il semble indéniable qu'au sein d'une tumeur la population cellulaire est hétérogène et que certaines cellules montrent des caractéristiques particulières de tumorigénicité. Même si les thérapies très agressives bloquant la croissance rapide des cellules cancéreuses semblent toujours indispensables pour stopper ou ralentir des formes de cancer très agressives ou à des stades très avancés, ces dernières ne suffisent pas à éradiquer cette sous-population de cellules souches. Certaines études sont en cours pour cibler ce groupe cellulaire (ciblage de la prograstine des cellules colorectales qui réduit leur capacité d'autorenouvèlement[356]) mais il est souvent difficile de trouver des cibles thérapeutiques qui n'affectent pas les cellules souches saines indispensables à la vie du tissu d'origine. De plus, nous avons vu que la contrainte mécanique pouvait stopper la prolifération cellulaire : ce phénomène influe donc directement sur l'efficacité des traitements ciblant les cellules en prolifération. Enfin, au vu de leur incroyable plasticité, il semble plus juste d'aborder le concept des cellules souches cancéreuses comme un état cellulaire dynamique. Si les thérapies ont toujours eu pour but d'éradiquer toutes les cellules cancéreuses pour permettre une rémission complète des patients, il est peut-être intéressant d'aborder le cancer plutôt comme une maladie chronique où il faut contenir les cellules cancéreuses et empêcher leur expansion. L'étude du phénomène de compétition cellulaire rentrant en jeu lors de la progression tumorale pourrait permettre d'envisager ce genre de procédé et nul doute qu'une meilleure compréhension de ce dernier passe par une meilleure compréhension des signaux mécaniques.

Matériels et Méthodes Chapitre 3 :

Culture cellulaire

Les cellules hématopoïétiques immatures TF1-GFP et TF1-BA ont été obtenues et validées comme décrit en[113]. Elles sont gardées en culture en suspension dans du RPMI1640 (Gibco) où est ajouté 10% de sérum de veau fœtal (FCS, Life) et 1% pénicilline/streptomycine (Life Technologies). La lignée cellulaire HS27A, modèle des cellules stromales mésenchymes, provient de ATCC et est cultivée en adhésion dans du milieu RPMI, 10% SVF. Les cellules MCF10A, également obtenues chez ATCC, sont mises en culture dans du DMEM/F-12 supplémenté par 5% de sérum de cheval (Life), 10 µg/mL insuline, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 100 ng/mL toxine de choléra, 20 ng/mL EGF (Sigma), 1% pénicilline/streptomycine. Les passages sont effectués à confluence à l'aide de trypsine.

Fabrication du Wafer de silicium :

Les motifs du gel en agarose sont créés sur des wafers de silicium par photolithographie. Une fine couche de résine négative photosensible (SU8 2000 series, Microchem) est déposée sur le substrat par induction centrifuge, chauffé sur plaque chauffante et exposé aux rayons UV au travers d'un masque bicolore (Clewin4, WIEWEB software) représentant le motif voulu. Après développement en immersion dans du PGMEA (Propylene glycol monomethyl ether acetate 484431, Sigma), le substrat est à nouveau placé sur plaque chauffante et nettoyé avec de l'isopropanol et de l'eau distillée. La hauteur de résine est contrôlée à l'aide d'un profilomètre de contact Veeco Dektak 150.

Le tableau ci-dessous représente les paramètres utilisés pour les différents wafers nécessaires à cette étude. Pour les moules de 9 µm utilisés pour les tests de co-culture, le procédé utilisé pour la réalisation des moules de 5 µm est effectué deux fois successivement.

Hauteur	Résine	Paramètre de spin coating	Cuisson avant dépôt	Insolation	Cuisson après dépôt
5 µm	SU8 2005	Vitesse 500 rpm, acceleration 200, 10s vitesse 2500 rpm, acceleration 500, 30s	2 min, 95°C	110 mJ	3 min , 95°C
30 µm	SU8 3050	Vitesse 500 rpm, acceleration 1, 10s Vitesse 4000 rpm, acceleration 3, 30s	10 min, 95°C	170 mJ	1 min, 65°C puis 5 min, 95°C

Tableau 2 : Paramètres utilisés pour la fabrication des moules en silicium utiles dans cette étude. Procédé de photolithographie. Les moules de 9 µm sont réalisés en reproduisant deux fois de suite les paramètres utilisés pour la hauteur de 5 µm.

Moulage des gels d'agarose

Une solution d'agarose standard (3810, Cart ROTH) diluée dans de l'eau distillée (4% (m/v)) est préparée et dissoute à l'autoclave à 120°C pendant 15 min. Des billes fluorescentes (Ø 0,40 µm, BZ5400, Interchim Fluoprobes) sont éventuellement ajoutées après 30 s de bain à ultrason pour la visualisation des piliers en microscopie confocale. La solution stock est maintenue à l'état liquide tout le long du moulage à l'aide d'un bain à sec (température voir Tableau 3). 800 µL de solution sont déposés sur le wafer

préchauffé sur une plaque chauffante (température voir Tableau 3). L'ensemble est alors retiré de la plaque chauffante et la position est maintenue jusqu'à gélification de l'agarose (suivant la température et le temps défini par le type d'agarose tableau n°2). Des trous sont ensuite percés au travers du support en Polycarbonate à l'aide de puncher 20G. Le support en polycarbonate contenant le gel en agarose est placé dans du PBS (Gibco) et stérilisé par rayonnements UV (20 min de chaque côté Vilber Loumat, 24W, 365/254 nm). Il est ensuite stocké à 4°C dans du PBS. Au moins 3 h avant le montage, les gels et les supports sont incubés à 37°C dans du milieu de culture.

Type d'agarose	T°C plaque chauffante	T°C plaque chauffante	T°C gélification	Temps de gélification
Agarose standard	78°C	90°C	Température ambiante	10 min
Agarose Ultra-Low	50°C	60°C	4°C sous lit de glace	72 h

Tableau 3 : Paramètres de moulage des gels en agarose suivant le type d'agarose utilisé.

Assemblage du système de confinement

Avant le montage, les différentes pièces sont nettoyées individuellement à l'éthanol 70% puis rincées à l'eau distillée et séchées à l'air. Une lamelle de verre (Ø30 mm No1, 631-1585, VWR) et deux joints toriques empilés l'un sur l'autre (24,50x3,00 mm silicone 70 shores FDA, Fishop) sont ensuite placés entre les deux parties en acier inoxydable et le tout est assemblé par 6 vis serrées petit à petit et en étoile. Le montage est ensuite stérilisé par autoclave (7 min, 134 °C) et laissé refroidir à température ambiante avant ensemencement des cellules.

Ensemencement et montage

Les cellules adhérentes MCF10A et HS27A sont ensemencées la veille du montage (500 µL par système à $2x10^5$ cellules/mL) directement sur lamelle de verre. Pour les cellules TF1, une solution de fibronectine (F.895 Sigma-Aldrich, 50 µg/mL dans du $NaHC0_3$) est incubée 30 min à 37°C et trois lavages au PBS sont effectués afin d'enlever l'excès de solution. Les cellules sont ensuite ajoutées ($5,6x10^5$ cellules/mL pour les TF1-GFP, $10,2x10^5$ cellules/mL pour les TF1-BA, 500 µL par lamelle) et laissées sédimenter et adhérer 2 h à 37°C. Des rinçages avec du milieu de culture permettent ensuite de récupérer les cellules TF1-GFP non adhérées. Les cellules TF1-BA adhérant très peu au substrat sont rincées en remplaçant simplement 200 µL de milieu de culture doucement à la pipette.

Un joint PDMS en forme de couronne est positionné sur la lamelle de verre avant l'ajout et incubation de fibronectine pour limiter les cellules à la zone où seront présents les piliers d'agarose pour les analyses RT-qPCR des cellules TF1-GFP. Il est retiré avant de placer le support en PC et gel d'agarose.

Pour les tests avec ajout d'Imatinib, 2 µM de molécules est ajouté lors de l'ensemencement.

Viabilité cellulaire

Les tests de viabilité cellulaire sont effectués par un double marquage calcéine (C1430, Thermofisher) et Iodure de Propidium (P4170,IP, Sigma). Le gel d'agarose est retiré du système et un maximum de milieu de culture est enlevé par aspiration et les cellules sont rincées avec du PBS préchauffé. Une solution de calcéine (1 µM) et IP (2 mg/mL) dilué dans du PBS est incubée 20 minutes à 37°C avant visualisation par épifluorescence. Un contrôle du marquage est réalisé en parallèle, les cellules sont

incubées dans des boites de pétri 24 h à 37°C. Pour le test des cellules mortes, de l'éthanol 70% est ajouté 30 minutes avant le marquage.

Immunomarquage

Les cellules sont fixées *in situ* avec du paraformaldehyde 4% (PFA, 15714, EM Grade) : le milieu de culture est aspiré et le système est rincé trois fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec 0.5% Triton X-100 (2156825000, Acros organics) dans du PBS pour 10 min à TA puis rincées trois fois avec 0.1% Triton X-100 et PBS toutes les 5 minutes. Une étape de blocage est ensuite réalisée avec une solution de 3% d'albumine de sérum bovin (BSA, A2163, Sigma) 0.1 % Triton X-100 dilué du PBS pendant 20 minutes à TA.

Pour les cellules adhérentes ou les expériences de co-culture, les systèmes sont démontés et les étapes de marquage sont réalisées en retournant les lamelles de verres sur du parafilm et 200 µL de solution. En revanche, pour les cellules non adhérentes, tout est effectué *in situ* 500 µL de la solution doublement concentrée est ajouté dans la réserve du système.

Marquage	Concentration	Incubation
Phalloidine Alexa 546,Thermofisher A22282	1:50, 0.1 % T-X 100, PBS	20 minutes, TA
NucGreen™ Thermofisher, R37109	2 gouttes/ml, PBS	15 minutes TA
YAP, Cellsignalling 14074	1:100, 0.1 % T-X 100/BSA 2%	12 h
TWIST Abcam ab50887	1:50, 0.1 % T-X 100/BSA 2%	12 h

Tableau 4 : Anticorps et conditions utilisées dans les étapes d'immunomarquage. Pour les cellules non adhérentes le marquage est effectué *in situ* la concentration est doublée et les incubations sont réalisées sur une nuit.

Le marquage des cellules prolifératives est réalisé avec le Click-iT® EdU Alexa Fluor® Imaging Kit (Molecular Probes). L'EdU (5-ethynyl-29-deoxyuridine) est un nucléoside analogue à la thymidine, qui est incorporé à l'ADN nouvellement synthétisé. A une concentration de 10µM, il est ajouté directement dans le milieu de culture. Sa détection est basée sur une « click » réaction catalysée par le cuivre, entre un acide et un alcyne. Suivant les données constructeurs, un tampon de révélation est réalisé juste avant et est ajouté aux échantillons pour une incubation à température ambiante, à l'abri de la lumière durant 30 minutes et rincé avec une solution 3% BSA dans du PBS.

Microscopie

Les cellules ont été observées en microscopie inversée (Leica DM IRB ou Leica DMI8) en contraste de phase pour le suivi de prolifération des trois lignées. Des images sont prises toutes les 24 h à l'aide d'un objectif 10x. Des expériences de vidéo-microscopie ont été mises en place sur 24 h dans une chambre à environnement contrôlé ($C0_2$, température, humidité). Une platine motorisée a permis de suivre 10 positions différentes pour un système à 30 µm et un système à 5 µm en parallèle. Les tests de viabilité ont été évalués en épifluorescence à l'aide d'un objectif 5x ou 10x.

Les images des cellules fixées et les expériences ayant permis l'évaluation de la hauteur des piliers en agarose et l'aire des cellules de TF1-GFP ont été obtenues par microscopie confocale (Leica SP5 confocal), avec un objectif 20x dry (NA 0.65) ou 40x à huile.

Analyse d'images et quantification

Concernant le suivi de prolifération des différents types cellulaires, le nombre de cellules de chaque image a été déterminé à l'aide du logiciel libre ImageJ en utilisant une routine personnalisée basée sur

l'outil "find maxima" du programme. La densité cellulaire (en cellules/ cm^2) a été analysée pour 10 positions différentes pour chaque expérience. Au minimum trois échantillons issus de deux séries indépendantes d'expériences ont été analysés pour chaque type cellulaire. Les expériences ont été stoppées lorsque la confluence ou les densités maximales de culture étaient atteintes pour chaque type cellulaire (3 jours pour les HS27 A, 2 jours pour les TF1-BA et 1 jour pour les MCF10A).

L'aire des cellules TF1-GFP et l'aire et la circularité des noyaux des cellules fixées TF1-BA ont été évaluées automatiquement à l'aide d'un programme conçu avec le logiciel Matlab. Après l'application d'un filtre adaptatif de wiener, une images binaire est créée afin de separer les cellules du fond de l'image puis différentes étapes séquentielles de reconstruction morphologique permettent de les détecter individuellement en appliquant différents paramètres de sélection (distance entre centroïde, aire, eccentricité). Au moins quatre différentes positions de la lamelle sont analysées pour chaque condition en prennant soin de définir une zone sans pilier.

La circularité nucléaire est définie par :

$$\text{Circularité} = \frac{4\pi\text{Aire}}{\text{Périmètre}^2}$$

Pour le ratio des cellules prolifératives, les noyaux sont repérés de la même manière sur les images des noyaux marqués sans distinction au NucGreen. Sur le canal correspondant aux marquages EdU, nous évaluons la valeur moyenne du signal sur une fenêtre d'observation autour des centroïdes repérés lors de l'étape précédente.

Western blot

Des analyses par WB ont été mises en place sur les cellules HS27A à l'issue de trois jours d'expériences. Elles ont été réalisées au sein du CRCL par S. Lefort. Les protéines sont extraites à l'aide d'un tampon de lyse RIPA 1X. 15 µg de protéines sont chargés sur le gel avant de conduire le SDS-PAGE et de les transférer sur une membrane pour le marquage (polyvinylidene difluoride membranes, Bio-Rad). Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps monoclonal ciblant la cycline B1 (PC133, Calbiochem) et GADPH (#8884, Cell Signalling Technology). La liaison spécifique des anticorps est testée en utilisant un anticorps secondaire approprié conjugué aux peroxydases de raifort et visualisé avec le substrat Clarity western ECL(Bio-rad). L'analyse densitométrique est effectuée à l'aide du logiciel ImageJ.

Rt-qPCR

Pour les analyses de RT-qPCR, les systèmes sont positionnés sur lit de glace, les supports PC et gel d'agarose sont retirés et les cellules sont directement reprises dans 500 µL de trizol. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. Ils sont ensuite effectués par Sandrine Jeanpierre au CRCL.

Analyses statistiques

Les tests statistiques Mann-Whitney et t-test sont utilisés pour définir la significativité des résultats. Les différences avec une p-value sous 0.05 sont considérées comme significatives (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$)

Matériels et méthodes Partie 4 :

Culture cellulaire

Les cellules colorectales

Les cellules de la lignée cellulaire d'adénocarcinomécolique sont issues de la société ATCC (CCL-247). Elles sont gardées en culture en deux dimensions dans des flasques classiques traitées pour la culture cellulaire (généralement T25, TPP 009025). Le milieu de culture utilisé est un milieu DMEM (1X) + GlutaMax (Dubecco's Modified Eagle Medium, Gibcon 61965) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, PAN biotech, P30-8500) et 2Mm de pénicilline/streptomycine (Gibco, 15140-122). Le milieu de culture est renouvelé tous les 2/3 jours et un passage est effectué quand 70% de confluence est observé. La TrypLE Express enzyme (1X, Gibco, 12604013) est utilisée pour détacher les cellules du substrat à 37°C pendant 5 minutes.

Les cellules de GBM

Les cellules N14 sont issues de nos collaborateurs de l'équipe du CRCL : "diversité du transcriptome des cellules souches" du docteur Mathieu Gabut. Elles sont gardées en culture en neurosphères, dans des boites de culture anti-adhésion (ULA Corning, Thermofisher, 10491623). Le milieu de culture est composé de DMEM/F12 (Life technologies, 31330-095) supplémenté par différents additifs : B27 (2%, Life technologies, 17504-001), N2 (1%, Life technologies, 17502-048), de facteurs de croissance EGF (20 ng/mL, Miltenyi Biotec, 130-093-825), FGF (20ng/mL, Miltenyi Biotec, 130-104-922), héparine (0.0002%, Sigma, H3149) et un mélange de Pénicilline et Streptomycine (1X, Life technologies, 15140-122). Le milieu de culture est renouvelé tous les 3/4 jours : la moitié du milieu de culture est échangé par du milieu frais doublement concentré. Lorsque les cellules doivent être dissociées (avant ensemencement dans les micropuits ou tous les 7 jours), les neurosphères sont centrifugées puis dissociées à l'Accumax (Sigma, A7089) 10 minutes minimum à 37°C (le temps d'incubation est parfois allongé lorsque des agrégats persistent).

Les cellules N14-Zsgreen ont été établies par le docteur Nabila Berabez durant sa thèse au sein de l'équipe du Dr Gabut. Elles sont issues d'une infection des cellules N14 par un rétrovirus produit par les cellules GP2-293 (BD Biosciences) transfectées par le plasmide Zsgreen-ODC. La validation de ce modèle a été effectuée par l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome MG132 (M8699, Sigma).

Moules en silicium et contre-moule en PDMS

Fabrication du moule sur wafer de silicium (h=250 µm)

Brièvement une résine photosensible (SU8 2100) est étalée de manière uniforme par centrifugation (500 tr/min, 10s puis 1200 tr/min, 30s). Cette résine est ensuite cuite (75°C, 20 min, puis 95 °C, 1 h), puis exposée aux UVs (360 mJ/cm²). La résine est recuite afin de solidifier l'accroche (75°C, 10 min puis 95 °C, 5 min). Enfin, le motif est développé (solution de PGMEA, 18 min) afin d'enlever la résine non exposée aux UVs. Ce 1er moule ainsi réalisé est ensuite silanisé la nuit avant d'être utilisable pour mouler le contre-moule en PDMS.

Un contre-moule est fabriqué en PDMS réutilisable plusieurs fois. La base et le réticulant sont mélangés (rapport 10 :1 en masse), puis mis sous vide pendant 30 min afin d'éliminer les bulles. Le PDMS est alors étalé sur le moule en silicium et recuit 2 h à 75°C sur plaque chauffante. Après recuit, le PDMS est décollé du moule en silicium.

Traitement lamelles

Les lamelles de verre sont nettoyées à l'éthanol 70% puis rincées à l'eau distillée. Elles sont fonctionnalisées avec l'amino-propyl-tri(ethoxy)silane (APTS 430941000 Airoseal 1%, dans une solution d'acide acétique 5 Mm (PRODUCT 20104298), 20 min, température ambiante sous agitation sous hotte à flux laminaire). Elles sont ensuite lavées à l'eau distillée trois fois et recuites 15 min à 100°C (afin de solidifier la couche de silane) sur plaque chauffante ou au four. Elles peuvent être préparées à l'avance et stockées à température ambiante, à l'abri de la poussière.

Pour la première solution de montage avec les lamelles de grande taille, celles-ci sont manipulées manuellement et individuellement à chaque étape ce qui devient très chronophage pour les 24 puits. Pour l'utilisation au sein de plaques multi puits, des portoirs de lamelles sont utilisés afin d'effectuer des bains pour les étapes d'incubation et rinçage.

Moulage des puits d'agarose

Les micro-puits ont été moulés à partir de 2 types d'agarose, à choisir en fonction de la rigidité souhaitée. Les contre-moules en PDMS sont disposés sur une plaque chauffante (à 78°C ou 50°C selon le type d'agarose utilisé, voir tableau 1). L'agarose est préparée en mélangeant la poudre (% selon Tableau 5) avec de l'eau distillée. La poudre d'agarose est dissoute dans l'eau distillée à l'aide d'un autoclave (120°C, 15 min). La solution ainsi obtenue est maintenue à l'état liquide à l'aide d'un bain à sec réglé sur la température souhaitée (Tableau 5), des billes fluorescentes sont ajoutées si besoin à la préparation après sonication. Un volume d'agarose (déterminé en fonction de la taille des puits à mouler : 120 µL pour Ø200 µm et 100 µL pour Ø100 µm) est ensuite déposé sur les contre-moules en PDMS chaud. Une lamelle fonctionnalisée à l'APTS est ensuite déposée sur la goutte d'agarose afin de l'étaler sur une épaisseur constante. L'ensemble (moule PDMS-agarose-lamelle) est alors retiré de la plaque chauffante et laissé à gélifier selon le temps et la température indiqués dans le Tableau 5.

Type d'agarose	Température du moule PDMS	Température du bain (stockage de la solution d'agarose)	Etape de Gélification
Agarose Ultra Low 2% m/v	50 °C	60°C	4°C sur lit de glace, 72 h
Agarose standard 2% m/v	78°C	90°C	TA, 5 min

Tableau 5 : Paramètres de moulage des micropuits utilisés en fonction du type d'agarose choisi. *Les références des produits sont identiques à celles présentées dans la partie précédente.*

Montage des systèmes

Grandes lamelles

Les tubes Falcon sectionnés sont lavés à l'éthanol 70% et rincés à l'eau distillée avant d'être placés autour du gel d'agarose. Un joint siliconé (SI 5398 Loctite) est placé tout autour, il durcit en quelques minutes à l'air libre.

Petites lamelles

Les lamelles sont positionnées au fond des plaques multipuits percées à la scie cloche, de la colle UV photosensible est déposée tout autour à la seringue et le tout est placé 10 secondes sous rayonnements UV.

Les gels d'agarose sont gardés dans du PBS durant ces étapes afin de ne pas les laisser se déshydrater. Les montages sont ensuite stérilisés par rayonnements UV pendant 20 minutes dans du PBS stérile.

Ensemencement cellules

Les micro-puits sont incubés dans du milieu de culture à 37°C, minimum 2 h avant utilisation. Les cellules sont ensuite ensemencées, la concentration dépend de l'utilisation : 1,2 10^5 cellules dans 3 mL par puits pour les sphéroïdes et 4,5.10^4 cellules pour 1.5 ml pour les cellules seules. Les systèmes sont mis sous agitation pendant 2 h à l'incubateur à 160 rpm (agitateur va et vient pour microplaques) pour la formation de sphéroïdes ou 45 min pour les cellules seules. Ils sont ensuite rincés trois fois avec du milieu de culture préchauffé afin de retirer les cellules qui ne sont pas dans les micropuits. L'agitation n'est pas indispensable pour la formation de sphéroïdes, elle n'a pas été possible pour toutes les expériences présentées dans ce manuscrit. Son effet sur l'homogénéité des sphéroïdes ou le nombre de puits présentant des cellules uniques n'a pas été quantitativement analysé.

Immunomarquage

Les sphéroïdes sont fixés à l'intérieur des micropuits de la même manière que pour les microsystèmes présentés dans la partie précédente. Les produits et références utilisés sont identiques. Le tableau ci-dessous récapitule les différentes étapes successives nécessaires au marquage.

Etape	Produit	Incubation
Rinçage	PBS, 1X, 1mL/puit	3x 5 minutes TA
Fixation	PFA, 4%, 200 µL / puit	20 minutes TA
Rinçage	PBS, 1X, 1mL/puit	3x5 minutes TA
Perméabilisation	PBS+ 0.5 T-X, 200 µL/puit	20 minutes TA
Rinçage	PBS+0.1 T-X, 1mL/ puit	3x5 minutes TA
Blocage	PBS+BSA 3%, 1mL/puit	
Marquage Actine	Phalloidine 1 :50, 0.1 % T-X 100, PBS 200 µL/puit	4°C, une nuit

Rinçage	PBS, 1X, 1mL/ puit	3x5 minutes TA
Marquage Nucléaire	NucGreen™ 2 gouttes/puit, PBS	
Rinçage	PBS, 1X, 1mL/ puit	3x5 minutes TA

Tableau 6 : Description des étapes effectuées pour le marquage fluorescent des sphéroïdes au sein des système de micropuits d'agarose. Les références sont identiques aux produits utilisés et explicités dans la partie précédente.

Le marquage des cellules prolifératives est réalisé avec le Click-iT® EdU Alexa Fluor® Imaging Kit (Molecular Probes) comme pour la partie prcédente. Il est ajouté directement dans le milieu de culture à 10 µM. Suivant les données constructeurs, un tampon de révélation est réalisé juste avant et est ajouté aux échantillons pour une incubation à température ambiante, à l'abri de la lumière durant 30 minutes et rincé avec une solution 3% BSA dans du PBS. Il est ajouté 24 h avant fixation et révélation pour les sphéroïdes HCT116 et 72 h pour les N14.

Pour Olig2 (AB9610, Sigma), la perméabilisation est effectuée avec une solution de Tween à 0,1% pendant 1 heure, l'anticorps est utilisé à 1 :500 (dans PBS, BSA5%, Tween 0,1%) durant la nuit à 4°C.

Clarification

Les micropuits d'agarose "flottants" contenant les sphéroïdes sont découpé grâce à des punchers de biopsies, puits insérés sur une lamelle dans des cales d'espacement autocollants (Sunjinlab iSpacer 4-0.5 (4 puits, 0.5 mm de hauteur, 7 mm de diamètre). Ils sont incubés avec la solution de clarification commercial Rapiclear 1.52 (Sunjinlab, un bain la nuit, suivi d'un changement de bain avec une nouvelle solution le matin). Les échantillons sont ensuite scellés avec une lame et imagé au confocal le jour même.

Suivi de prolifération

Un microscope inversé (Leica DM IRB ou DMI8) en contraste de phase est utilisé pour le suivi de croissance des agrégats couplé à un objectif 20x ou 10x. Ces derniers sont dotés d'une chambre environnementale et d'un contrôleur de CO_2 qui permettent d'effectuer des analyses en timelapse. Une platine motorisée permet ensuite de suivre différentes positions des systèmes en micropuits. Une image est acquise toutes les 2 h pour l'expérience sur les HCT116 et pour 9 sphéroïdes et toutes les 30 minutes pour 63 sphéroïdes.

L'aire des sphéroïdes pour chaque image acquise est analysée à l'aide d'une routine développée sur le logiciel MATLAB. La méthode de Hough permet tout d'abord de repérer la position des puits, le contour de l'agrégat est ensuite détecté par binarisation et étapes successives de reconstruction morphologique.

Suivi dynamique de cellules individuelles au sein de sphéroïdes

Les mêmes outils que ceux présentés dans la section précédente sont utilisés pour le suivi dynamique de cellules fluorescentes au sein de sphéroïdes ; à ceux-là sont rajoutés une prise d'image fluorescente à l'aide d'une lampe LED coolsnap consécutivement à chaque prise en lumière blanche. Un z-stack est effectué tous les 4 µm et sur la totalité de l'agrégat. 9 sphéroïdes ont été suivis durant 42 heures avec des prises d'images toutes les 30 minutes.

Le suivi dynamique de chaque entité fluorescente est effectué de manière automatique une nouvelle fois à l'aide d'un programme développé sous Matlab, en utilisant un algorithme de tracking présenté dans le chapitre 4.

Suivi de cellules seules

Les expériences présentées dans la partie 2.3 ont été effectuées en contraste de phase avec des objectifs 10x ou 20x. Trois réplicas ont été effectués, l'une avec un intervalle de temps de 10 minutes sur 70 h et deux autres avec des images acquises toutes les 2 h durant 120 heures pour une centaine de cellules isolées à chaque fois. La proportion de cellules donnant lieu à la formation d'un sphéroïde est analysée manuellement.

Acquisition d'images d'immunomarquage

Les images de marquage fluorescent ont été à faites l'aide d'un microscope confocal Leica SP5 et d'un objectif à air (Ouverture numérique 0,65). Des Z-stacks des sphéroïdes ont été réalisées à l'objectif dry X20 en utilisant des pas de 0,42µm.

Inclusion agarose

Des sphéroïdes de HCT116 sont tout d'abord formés à l'aide de réseaux de micropuits réalisés en agarose standard 2% (v/m), sans adhésion sur lamelles, simplement déposés à l'intérieur d'une plaque de culture classique 24 puits. 24 h après ensemencement, les réseaux de micropuits sont retournés dans les puits sur 100 µL de culture et on laisse les sphéroïdes sédimenter pendant 30 minutes. Les sphéroïdes sont ensuite récupérés à la pipette, centrifugés et comptés.

En parallèle, des solutions d'agarose low melt gelling point (1% et 0.5 m/v) sont préparées et passées à l'autoclave (15 min 120°C) et gardées à 39°C. 200 µL sont déposés dans chaque puits et sont laissés à gélifier à TA pendant 8 minutes pour constituer une première couche. Les sphéroïdes sont ajoutés aux solutions lorsque ces dernières atteignent une température de 38°C pour empêcher une détérioration des cellules à température trop élevée ainsi qu'une gélification de l'agarose. 500 µL de solution d'agarose et sphéroïdes est ajoutée dans les puits et laissé à TA pour gélification pendant 10 minutes. 100 µL de milieu sont ensuite ajoutées dans chaque puits.

Le suivi de prolifération est réalisé par contraste de phase avec un intervalle de temps de 2 h durant 84 heures.

Microscopie à force de Traction (TFM)

Conformation cylindrique

Des cellules HCT116 sont ensemencées dans des micropuits d'agarose Ultra low melt (2% m/v) préparés comme mentionné précédemment. Des billes Ø 0,40 µm sont ajoutées à l'agarose à une concentration de 63 µl/ mL. Les images sont acquises en épi fluorescence à l'aide d'un objectif à air 20x (ouverture numérique 0,65). Toutes les deux heures une image en contraste de phase est couplée à une image en fluorescence tous les 1,6 µm sur la totalité de l'agrégat durant 26 h après que les sphéroïdes ont atteint les bords du puits. L'analyse des déplacements est effectuée sur une projection en z de 14 slices, pour 70 000 points, un niveau de pyramide de 2, des fenêtres de taille 40 pixels, un nombre maximum d'itération de 20 et un seuil de 0.1.

Inclusion dans l'agarose

Des agrégats de cellules HCT116 sont inclus dans de l'agarose Low melt gelling point (A9614, Sigma aldrich, 1% m/v) de la même manière que présentée dans la section ci-dessus. L'acquisition d'images est effectuée également en épi fluorescence et à l'aide d'un objectif 40x pour un intervalle de temps de 3 h sur une durée de 39 heures.

L'algorithme de suivi des billes est réalisé sur un z donné au centre de l'agrégat. Les paramètres sont les suivant : en nombre de points suivis : 4935, niveau de pyramide :3, fenêtres de 30 pixels et 20 et 0,1 pour le nombre d'itération et le seuil respectivement.

Annexes

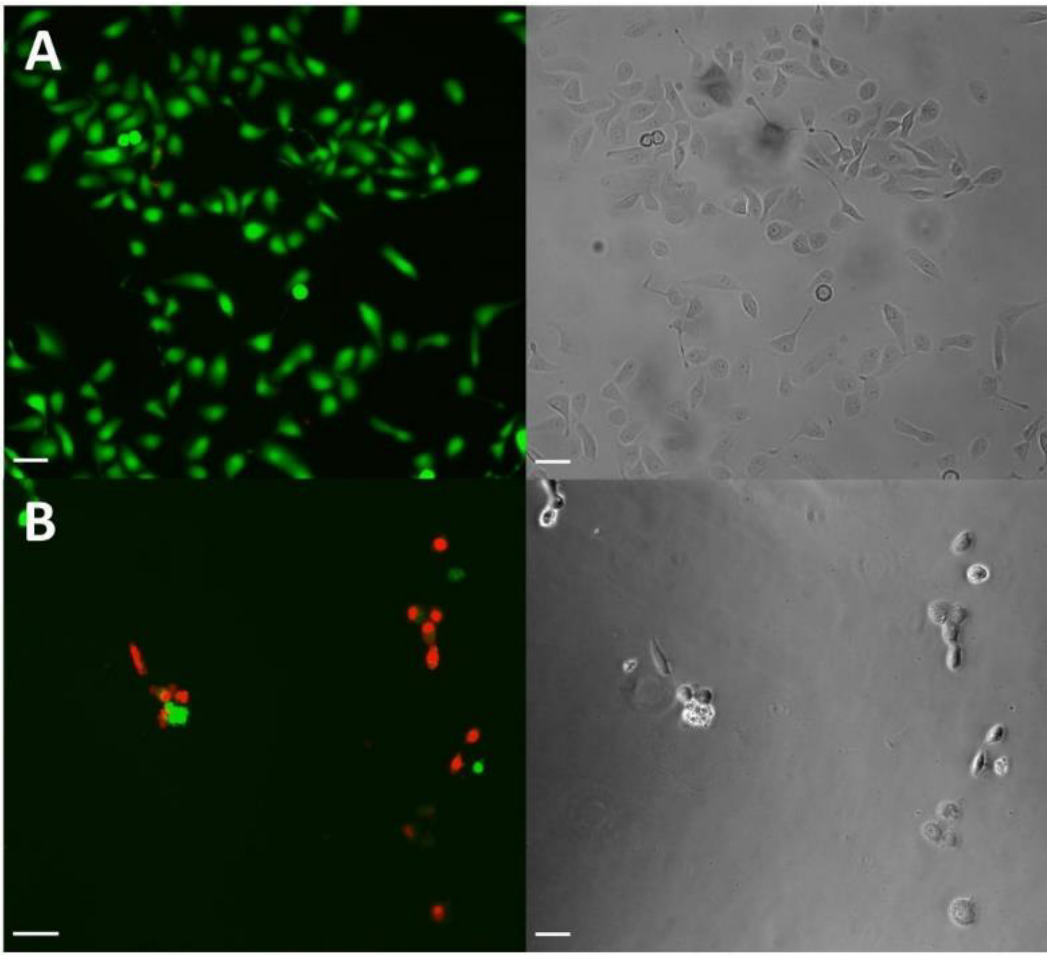


Figure SI 1 : Contrôle des marquages Live and Dead sur des celllules MCF10A 1 jour après ensemencement.

(A) Contrôle du marquage live (B) contrôle du marquage de cellules mortes : de l'éthanol 70 % est ajouté aux cellules 30 minutes avant le marquage. Echelle =100 µm Calcein Am est représenté en vert, l'iodure de propidium en rouge.

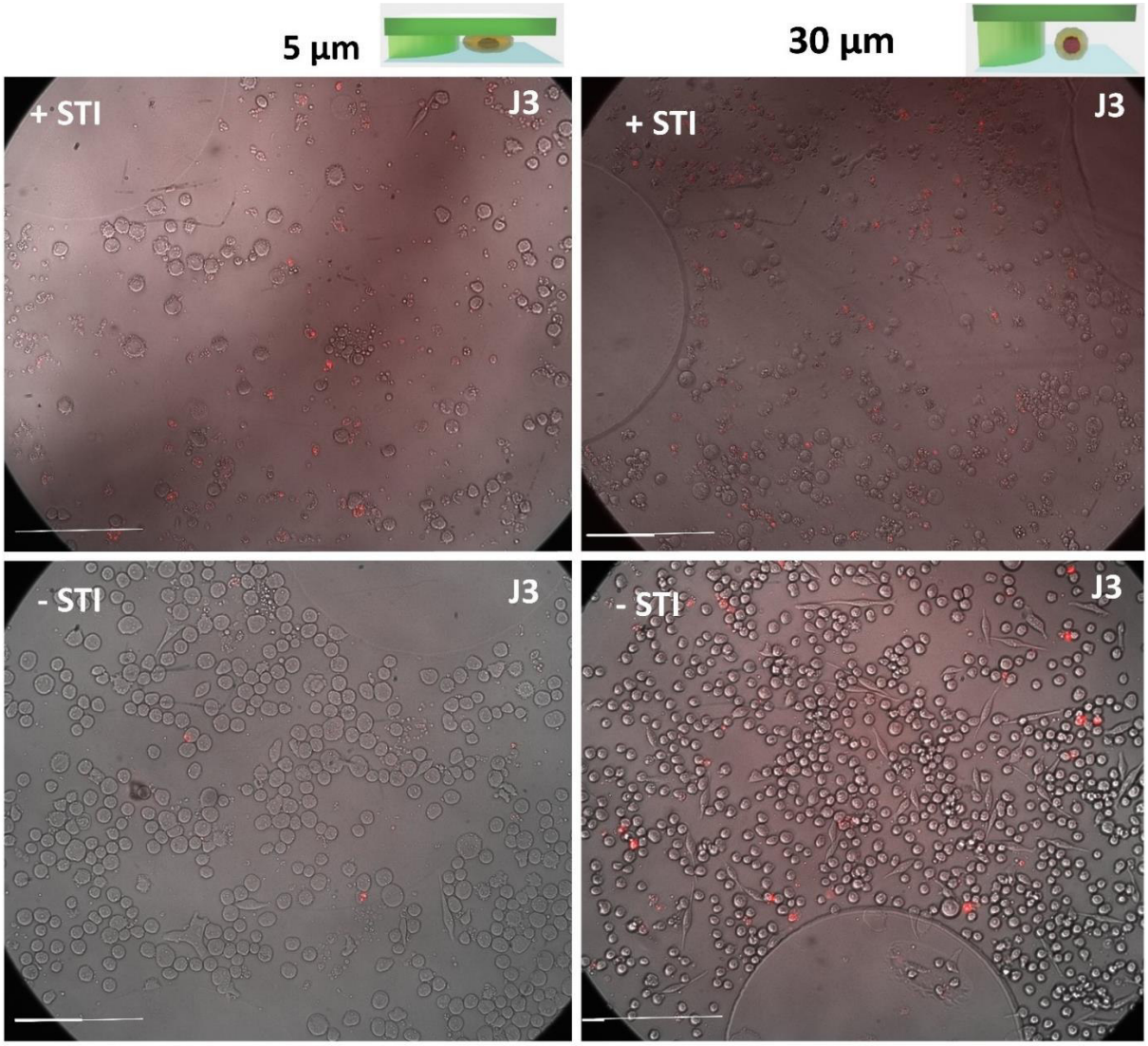


Figure SI 2 : TF1 BA à J3 avec et sans traitement à l'Imatinib 2 µM durant 3 jours (-STI : contrôle +STI : traitement), avec confinement à 5 µm à gauche et en condition contrôle à 30 µm à droite. Marquage des cellules mortes par ajout d'Iodure de Propidium (IP), image en lumière blanche couplé à une image en épi fluorescence correspondant au marquage rouge sur les images. Echelle = 50 µm.

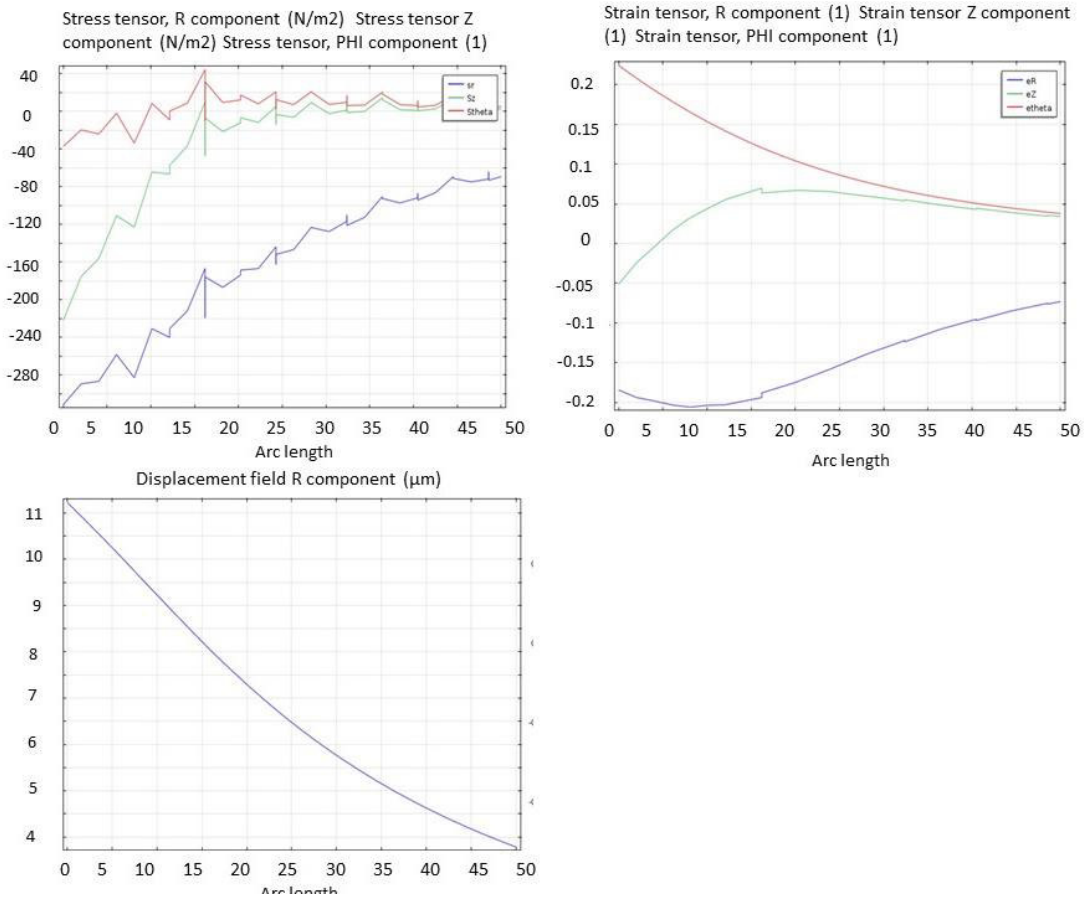


Figure SI 3 : Résultats obtenus par simulation à l'aide du logiciel Comsol : Géométrie 2D axisymétrique. Milieu élastique E=1000Pa $\boldsymbol{\nu = 0.49}$

Références

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
2. The History of Cancer: An Annotated Bibliography - Google Livres. https://books.google.fr/books?id=oAX8jOJ9uO0C&pg=PA245&lpg=PA245&dq=virchow+1845+cancer&source=bl&ots=0XudT8tHiV&sig=ACfU3U1fMfoMhVaPBppToN-VsPgpW3ZWUw&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwjwjtXW6IvoAhUL2BoKHRyWA9MQ6AEwBXoECAoQAQ#v=onepage&q=virchow 1845 cancer&f=false. Accessed March 8, 2020.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
5. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(5):1016-1036.
6. Weinberg RA. Coming full circle - From endless complexity to simplicity and back again. *Cell*. 2014;157(1):267-271. doi:10.1016/j.cell.2014.03.004
7. Cancer Today. https://gco.iarc.fr/today/home. Accessed March 2, 2020.
8. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M. Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005;366(9499):1784-1793. doi:10.1016/S0140-6736(05)67725-2
9. Tomasetti C, Vogelstein B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (80-)*. 2015;347(6217):78-81. doi:10.1126/science.1260825
10. Un budget recherche préservé dans le Plan cancer. https://www.lemonde.fr/sciences/article/2014/02/04/un-budget-recherche-preserve-dans-le-plan-cancer_4359662_1650684.html. Accessed March 20, 2020.
11. Levitin HM, Yuan J, Sims PA. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Tumor Heterogeneity. *Trends in cancer*. 2018;4(4):264-268. doi:10.1016/j.trecan.2018.02.003
12. Suvà ML, Tirosh I. Single-Cell RNA Sequencing in Cancer: Lessons Learned and Emerging Challenges. *Mol Cell*. 2019;75(1):7-12. doi:10.1016/j.molcel.2019.05.003
13. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, et al. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-690. doi:10.1016/j.cell.2014.09.050
14. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70. doi:10.1038/nature11412
15. Li H, Courtois ET, Sengupta D, et al. Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nat Genet*. 2017;49(5):708-718. doi:10.1038/ng.3818
16. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science (80-)*. 2016;352(6282):189-196. doi:10.1126/science.aad0501
17. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature*. 2019;575(7782):299-309. doi:10.1038/s41586-019-1730-1
18. Liu P, Erez A, Nagamani SCS, et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell*. 2011;146(6):889-903. doi:10.1016/j.cell.2011.07.042
19. Mazor T, Pankov A, Song JS, Costello JF. Intratumoral Heterogeneity of the Epigenome. *Cancer Cell*. 2016;29(4):440-451. doi:10.1016/j.ccell.2016.03.009
20. Bhang HEC, Ruddy DA, Radhakrishna VK, et al. Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. *Nat Med*. 2015;21(5):440-448. doi:10.1038/nm.3841
21. Kim C, Gao R, Sei E, et al. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. *Cell*. 2018;173(4):879-893.e13. doi:10.1016/j.cell.2018.03.041

22. Murugaesu N, Wilson GA, Birkbak NJ, et al. Tracking the genomic evolution of esophageal adenocarcinoma through neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Discov*. 2015;5(8):821-832. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0412
23. Sun C, Bernards R. Feedback and redundancy in receptor tyrosine kinase signaling: Relevance to cancer therapies. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(10):465-474. doi:10.1016/j.tibs.2014.08.010
24. Moscow JA, Fojo T, Schilsky RL. The evidence framework for precision cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(3):183-192. doi:10.1038/nrclinonc.2017.186
25. Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol*. 2014;32(1):40-51. doi:10.1038/nbt.2786
26. Dowden H, Munro J. Trends in clinical success rates and therapeutic focus. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(7):495-496. doi:10.1038/d41573-019-00074-z
27. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):839-845. doi:10.1038/nrm2236
28. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model. *J Biomol Screen*. 2004;9(4):273-285. doi:10.1177/1087057104265040
29. Bingle L, Lewis CE, Corke KP, Reed M, Brown NJ. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br J Cancer*. 2006;94(1):101-107. doi:10.1038/sj.bjc.6602901
30. Villaronga MÁ, Teijeiro SÁ, Hermida-Prado F, Garzón-Arango M, Sanz-Moreno V, García-Pedrero JM. Analysis of invasive activity of CAF spheroids into three dimensional (3D) collagen matrices. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1731. Humana Press Inc.; 2018:145-154. doi:10.1007/978-1-4939-7595-2_14
31. Walker TL, Kempermann G. One mouse, two cultures: Isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice. *J Vis Exp*. 2014;(84):e51225. doi:10.3791/51225
32. Courau T, Bonnereau J, Chicoteau J, et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):74. doi:10.1186/s40425-019-0553-9
33. Lamichhane SP, Arya N, Kohler E, Xiang S, Christensen J, Shastri VP. Recapitulating epithelial tumor microenvironment in vitro using three dimensional tri-culture of human epithelial, endothelial, and mesenchymal cells. *BMC Cancer*. 2016;16(1):581. doi:10.1186/s12885-016-2634-1
34. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(7):407-418. doi:10.1038/s41568-018-0007-6
35. Aboulkheyr Es H, Montazeri L, Aref AR, Vosough M, Baharvand H. Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends Biotechnol*. 2018;36(4):358-371. doi:10.1016/j.tibtech.2017.12.005
36. Weeber F, Ooft SN, Dijkstra KK, Voest EE. Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chem Biol*. 2017;24(9):1092-1100. doi:10.1016/j.chembiol.2017.06.012
37. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*. 2018;172(1-2):373-386.e10. doi:10.1016/j.cell.2017.11.010
38. Simian M, Bissell MJ. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol*. 2017;216(1):31-40. doi:10.1083/jcb.201610056
39. Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(2):65-81. doi:10.1038/s41568-018-0104-6
40. Gould SE, Junttila MR, De Sauvage FJ. *Translational Value of Mouse Models in Oncology Drug Development*. Vol 21. Nature Publishing Group; 2015:431-439. doi:10.1038/nm.3853
41. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, et al. A molecularly annotated platform of patient- derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2011;1(6):508-523. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0109
42. Willyard C. The mice with human tumours: Growing pains for a popular cancer model. *Nature*.

2018;560(7717):156-157. doi:10.1038/d41586-018-05890-8
43. Choi Y, Lee S, Kim K, Kim SH, Chung YJ, Lee C. Studying cancer immunotherapy using patient-derived xenografts (PDXs) in humanized mice. *Exp Mol Med*. 2018;50(8). doi:10.1038/s12276-018-0115-0
44. Albert Pan Y, Freundlich T, Weissman TA, et al. Zebrabow: Multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Dev*. 2013;140(13):2835-2846. doi:10.1242/dev.094631
45. Delloye-Bourgeois C, Bertin L, Thoinet K, et al. Microenvironment-Driven Shift of Cohesion/Detachment Balance within Tumors Induces a Switch toward Metastasis in Neuroblastoma. *Cancer Cell*. 2017;32(4):427-443.e8. doi:10.1016/j.ccell.2017.09.006
46. Dick JE, Bonnet D. Human Acute Myeloid Leukaemia is organised as a heirarchy that originates from a primitive haematopoetic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-737.
47. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. 2003;100(7):3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
48. Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res*. 2012;2(3):340-356.
49. Barbato L, Bocchetti M, Di Biase A, Regad T. Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells*. 2019;8(8):926. doi:10.3390/cells8080926
50. Baccelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol*. 2012;198(3):281-293. doi:10.1083/jcb.201202014
51. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: A question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(6):449-458. doi:10.1038/nrc1886
52. Wu XZ. Origin of cancer stem cells: The role of self-renewal and differentiation. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(2):407-414. doi:10.1245/s10434-007-9695-y
53. Chaffer CL, Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov*. 2015;5(1):22-24. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0788
54. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23(10):1124-1134. doi:10.1038/nm.4409
55. Dieter SM, Ball CR, Hoffmann CM, et al. Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell*. 2011;9(4):357-365. doi:10.1016/j.stem.2011.08.010
56. Piccirillo SGM, Combi R, Cajola L, et al. Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene*. 2009;28(15):1807-1811. doi:10.1038/onc.2009.27
57. Brooks MDD, Burness MLL, Wicha MSS. *Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer*. Vol 17. Cell Press; 2015:260-271.
58. Sousa B, Ribeiro AS, Paredes J. Heterogeneity and plasticity of breast cancer stem cells. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1139. Springer New York LLC; 2019:83-103. doi:10.1007/978-3-030-14366-4_5
59. Fujii M, Shimokawa M, Date S, et al. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):827-838. doi:10.1016/j.stem.2016.04.003
60. Nagare RP, Sneha S, Priya SK, Ganesan TS. Cancer stem cells - Are surface markers sufficient alone? *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;(January 2017). doi:10.2174/1574888X11666160607211
61. Takaishi S, Okumura T, Tu S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*. 2009;27(5):1006-1020. doi:10.1002/stem.30
62. Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2009;36(3):446-453. doi:10.1016/j.ejcts.2009.03.063
63. Jaksch M, Múnera J, Bajpai R, Terskikh A, Oshima RG. Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines. *Cancer Res*. 2008;68(19):7882-7886. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0723
64. Dahlrot RH, Hermansen SK, Hansen S, Kristensen BW. What is the clinical value of cancer stem

cell markers in gliomas? *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(3):334-348.
65. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):555-567. doi:10.1016/j.stem.2007.08.014
66. Hayashi K, Tamari K, Ishii H, et al. Visualization and characterization of cancer stem-like cells in cervical cancer. *Int J Oncol*. 2014;45(6):2468-2474. doi:10.3892/ijo.2014.2670
67. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. *Cancer Stem Cells*. Vol 355.; 2018. doi:10.1056/NEJMra061808
68. Balasubramaniyan V, Vaillant B, Wang S, et al. Aberrant mesenchymal differentiation of glioma stem-like cells: Implications for therapeutic targeting. *Oncotarget*. 2015;6(31):31007-31017. doi:10.18632/oncotarget.5219
69. Li H, Fan X, Houghton JM. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem*. 2007;101(4):805-815. doi:10.1002/jcb.21159
70. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):225-238. doi:10.1016/j.stem.2015.02.015
71. Northey JJ, Przybyla L, Weaver VM. Tissue force programs cell fate and tumor aggression. *Cancer Discov*. 2017;7(11):1224-1237. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0733
72. Paszek MJ, Weaver VM. The tension mounts: Mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004;9(4):325-342. doi:10.1007/s10911-004-1404-x
73. Northcott JM, Dean IS, Mouw JK, Weaver VM. Feeling Stress: The Mechanics of Cancer Progression and Aggression. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6(February):1-12. doi:10.3389/fcell.2018.00017
74. Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027
75. Acerbi I, Cassereau L, Dean I, et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol (United Kingdom)*. 2015;7(10):1120-1134. doi:10.1039/c5ib00040h
76. Balleyguier C, Ciolovan L, Ammari S, et al. Breast elastography: The technical process and its applications. *Diagn Interv Imaging*. 2013;94(5):503-513. doi:10.1016/j.diii.2013.02.006
77. Pradhan S, Slater JH. Tunable hydrogels for controlling phenotypic cancer cell states to model breast cancer dormancy and reactivation. *Biomaterials*. 2019;215(April):119177. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.04.022
78. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012;196(4):395-406. doi:10.1083/jcb.201102147
79. Wei SC, Fattet L, Tsai JH, et al. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol*. 2015;17(5):678-688. doi:10.1038/ncb3157
80. Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The Role of Mechanical Forces in Tumor Growth and Therapy. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014;16:321-346. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-105259
81. Kalli M, Stylianopoulos T. Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Front Oncol*. 2018;8(March):55. doi:10.3389/fonc.2018.00055
82. Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(38):15101-15108. doi:10.1073/pnas.1213353109
83. Nia HT, Liu H, Seano G, et al. Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology. *Nat Biomed Eng*. 2017;1(1). doi:10.1038/s41551-016-0004
84. Stylianopoulos T, Martin JD, Snuderl M, Mpekris F, Jain SR, Jain RK. Coevolution of solid stress and interstitial fluid pressure in tumors during progression: Implications for vascular collapse. *Cancer Res*. 2013;73(13):3833-3841. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4521
85. Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol*. 1997;15:778-783. doi:10.1038/nbt0897-778
86. Desmaison A, Guill L, Triclin S, et al. Impact of physical confinement on nuclei geometry and cell division dynamics in 3D spheroids. *Sci Rep*. 2018;8(1):8785. doi:10.1038/s41598-018-27060-6

87. Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-Environmental Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells. Blagosklonny M V., ed. *PLoS One*. 2009;4(2):e4632. doi:10.1371/journal.pone.0004632
88. Jabbari E, Sarvestani SK, Daneshian L, Moeinzadeh S, Huang J, Cordenonsi M. Optimum 3D Matrix Stiffness for Maintenance of Cancer Stem Cells Is Dependent on Tissue Origin of Cancer Cells. Engler AJ, ed. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132377. doi:10.1371/journal.pone.0132377
89. Desmaison A, Frongia C, Grenier K, Ducommun B, Lobjois V. Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids. *PLoS One*. 2013;8(12):4-13. doi:10.1371/journal.pone.0080447
90. Delarue M, Poterewicz G, Hoxha O, et al. SCWISh network is essential for survival under mechanical pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(51):13465-13470. doi:10.1073/pnas.1711204114
91. Delarue M, Montel F, Vignjevic D, et al. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophys J*. 2014;107(8):1821-1828. doi:10.1016/j.bpj.2014.08.031
92. Montel F, Delarue M, Elgeti J, et al. Isotropic stress reduces cell proliferation in tumor spheroids. *New J Phys*. 2012;14(5):055008. doi:10.1088/1367-2630/14/5/055008
93. Montel F, Delarue M, Elgeti J, et al. Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Phys Rev Lett*. 2011;107(18):1-5. doi:10.1103/PhysRevLett.107.188102
94. Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(37):14843-14848. doi:10.1073/pnas.1309482110
95. Dolega ME, Delarue M, Ingremeau F, et al. Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nat Commun*. 2017;8(May 2016):14056. doi:10.1038/ncomms14056
96. Cattin CJ, Düggelin M, Martinez-Martin D, Gerber C, Müller DJ, Stewart MP. Mechanical control of mitotic progression in single animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(36):11258-11263. doi:10.1073/pnas.1502029112
97. Dumont S, Mitchison TJ. Compression regulates mitotic spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr Biol*. 2009;19(13):1086-1095. doi:10.1016/j.cub.2009.05.056
98. Lancaster OM, LeBerre M, Dimitracopoulos A, et al. Mitotic Rounding Alters Cell Geometry to Ensure Efficient Bipolar Spindle Formation. *Dev Cell*. 2013;25(3):270-283. doi:10.1016/j.devcel.2013.03.014
99. Tse HTK, Weaver WM, Di Carlo D. Increased Asymmetric and Multi-Daughter Cell Division in Mechanically Confined Microenvironments. Lam W, ed. *PLoS One*. 2012;7(6):e38986. doi:10.1371/journal.pone.0038986
100. Demou ZN. Gene Expression Profiles in 3D Tumor Analogs Indicate Compressive Strain Differentially Enhances Metastatic Potential. *Ann Biomed Eng*. 2010;38(11):3509-3520. doi:10.1007/s10439-010-0097-0
101. Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):63-73. doi:10.1038/nrm2597
102. Mendez MG, Janmey PA. Transcription factor regulation by mechanical stress. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(5):728-732. doi:10.1016/j.biocel.2012.02.003
103. Low BC, Pan CQ, Shivashankar GV, Bershadsky A, Sudol M, Sheetz M. YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth. *FEBS Lett*. 2014;588(16):2663-2670. doi:10.1016/j.febslet.2014.04.012
104. Panciera T, Azzolin L, Cordenonsi M, Piccolo S. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(12):758-770. doi:10.1038/nrm.2017.87
105. Nguyen CDKK, Yi C. YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Trends in Cancer*. 2019;5(5):283-296. doi:10.1016/j.trecan.2019.02.010
106. Curran T. Fos and Jun: Oncogenic Transcription Factors. *Tohoku J Exp Med*. 1992;168(2):169-174. doi:10.1620/tjem.168.169

107. Papachristou D, Pirttiniemi P, Kantomaa T, Agnantis N, Basdra EK. Fos- and Jun-related transcription factors are involved in the signal transduction pathway of mechanical loading in condylar chondrocytes. *Eur J Orthod*. 2006;28(1):20-26. doi:10.1093/ejo/cji101
108. Levayer R. Solid stress, competition for space and cancer: The opposing roles of mechanical cell competition in tumour initiation and growth. *Semin Cancer Biol*. 2019;(April):0-1. doi:10.1016/j.semcancer.2019.05.004
109. Vishwakarma M, Piddini E. Outcompeting cancer. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(3):187-198. doi:10.1038/s41568-019-0231-8
110. Levayer R, Hauert B, Moreno E. Cell mixing induced by myc is required for competitive tissue invasion and destruction. *Nature*. 2015;524(7566):476-480. doi:10.1038/nature14684
111. Broders-Bondon F, Nguyen Ho-Bouldoires TH, Fernandez-Sanchez M-E, Farge E. Mechanotransduction in tumor progression: The dark side of the force. *J Cell Biol*. 2018;217(5):1571-1587. doi:10.1083/jcb.201701039
112. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. 2006;169(2):338-346. doi:10.2353/ajpath.2006.060312
113. Laperrousaz B. Role of the microenvironment in maintenance and resistance of leukemic stem cells in Chronic Myelogenous Leukemia. BMP pathway and mechanical forces. 2015:233.
114. Weissman IL. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-168. doi:10.1016/S0092-8674(00)81692-X
115. Crisan M, Dzierzak E. Correction: The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity (Development, (2016) 143, (4571-4581), 10.1242/dev.114231). *Dev*. 2017;144(22):4195. doi:10.1242/dev.160812
116. Ichimaru M, Tomonaga M, Amenomori T, Matsuo T. Atomic bomb and leukemia. *J Radiat Res*. 1991;32 Suppl 2:14-19. doi:10.1269/jrr.32.supplement2_14
117. Sawyers CL. Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 1999;340(17):1330-1340. doi:10.1056/NEJM199904293401706
118. Leukemia - Cancer Stat Facts. https://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html#,. Accessed February 17, 2020.
119. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25(1):85-109. doi:10.1093/jnci/25.1.85
120. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18(2):189-218. doi:10.1038/sj.leu.2403241
121. PDQ Adult Treatment Editorial Board. *Chronic Myelogenous Leukemia Treatment (PDQ®): Patient Version*.; 2002.
122. Heisterkamp N, Jenster G, Ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*. 1990;344(6263):251-253. doi:10.1038/344251a0
123. Neves H, Ramos C, Gomes Da Silva M, Parreira A, Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARα genes: Evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood*. 1999;93(4):1197-1207. doi:10.1182/blood.v93.4.1197.404k33_1197_1207
124. Cilloni D, Saglio G. CML: a model for targeted therapy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(3):285-294. doi:10.1016/j.beha.2009.04.004
125. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(SUPPL. 1):11842-11849. doi:10.1073/pnas.2034201100
126. Jamieson CHM, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML. *N Engl J Med*. 2004;351(7):657-667. doi:10.1056/NEJMoa040258
127. STI-57 S mechanism for, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. *Science (80-)*. 2000;289(5486):1938-1942. doi:10.1126/science.289.5486.1938

128. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008;112(13):4808-4817. doi:10.1182/blood-2008-07-077958
129. Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;2009(1):461-476. doi:10.1182/asheducation-2009.1.461
130. Apperley JF. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007;8(11):1018-1029. doi:10.1016/S1470-2045(07)70342-X
131. Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;99(1):319-325. doi:10.1182/blood.V99.1.319
132. Roche-Lestienne C, Mahon FX, Preudhomme C. Origines de la résistance au traitement par imatinib mésylate: Un exemple riche d'enseignements. *Medecine/Sciences*. 2004;20(12):1125-1130. doi:10.1051/medsci/200420121125
133. Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood*. 2012;119(6):1501-1510. doi:10.1182/blood-2010-12-326843
134. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015;526(7571):126-130. doi:10.1038/nature15250
135. Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X, Yang H. The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):327. doi:10.1186/s13287-019-1422-7
136. Gurkan UA, Akkus O. The Mechanical Environment of Bone Marrow: A Review. *Ann Biomed Eng*. 2008;36(12):1978-1991. doi:10.1007/s10439-008-9577-x
137. Ghobrial IM, Detappe A, Anderson KC, Steensma DP. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: Implications for AML and MM. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(4):219-233. doi:10.1038/nrclinonc.2017.197
138. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(10):643-655. doi:10.1038/nrm3184
139. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*. 2006;20(3):161-171. doi:10.1016/j.blre.2005.11.002
140. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):285-316. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095919
141. Ivanovska IL, Shin JW, Swift J, Discher DE. Stem cell mechanobiology: Diverse lessons from bone marrow. *Trends Cell Biol*. 2015;25(9):523-532. doi:10.1016/j.tcb.2015.04.003
142. Chomel J-C, Aggoune D, Sorel N, Turhan AG. Leucémie myéloïde chronique. *médecine/sciences*. 2014;30(4):452-461. doi:10.1051/medsci/20143004022
143. Raic A, Naolou T, Mohra A, Chatterjee C, Lee-Thedieck C. 3D models of the bone marrow in health and disease: yesterday, today and tomorrow. *MRS Commun*. 2019;9(1):37-52. doi:10.1557/mrc.2018.203
144. Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, et al. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*. 2013;13(3):285-299. doi:10.1016/j.stem.2013.06.009
145. Nirmalanandhan VS, Hurren R, Cameron WD, et al. Increased pressure alters plasma membrane dynamics and renders acute myeloid leukemia cells resistant to daunorubicin. *Haematologica*. 2015;100(10):e406-e408. doi:10.3324/haematol.2015.129866
146. Shin JW, Mooney DJ. Extracellular matrix stiffness causes systematic variations in proliferation and chemosensitivity in myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(43):12126-12131. doi:10.1073/pnas.1611338113
147. Lekka M. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *Bionanoscience*. 2016;6(1):65-80. doi:10.1007/s12668-016-0191-3

148. Ramos JR, Pabijan J, Garcia R, Lekka M. The softening of human bladder cancer cells happens at an early stage of the malignancy process. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5(1):447-457. doi:10.3762/bjnano.5.52
149. Matthews HK, Ganguli S, Plak K, et al. Oncogenic signaling alters cell shape and mechanics to facilitate cell division under confinement. *bioRxiv*. 2019:571885. doi:10.1101/571885
150. Laperrousaz B, Berguiga L, Nicolini FE, et al. Revealing stiffening and brittling of chronic myelogenous leukemia hematopoietic primary cells through their temporal response to shear stress. *Phys Biol*. 2016;13(3). doi:10.1088/1478-3975/13/3/03LT01
151. Zheng Y, Wen J, Nguyen J, Cachia MA, Wang C, Sun Y. Decreased deformability of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Sci Rep*. 2015;5. doi:10.1038/srep07613
152. Wang K, Cheng J, Tan Q, Sun D. Probing mechanical behaviors of chronic myeloid leukemia cells in doxorubicin resistance by robotic manipulation with optical tweezers. *Proc IEEE Conf Nanotechnol*. 2013:191-194. doi:10.1109/NANO.2013.6720869
153. Lam WA, Rosenbluth MJ, Fletcher DA. Chemotherapy exposure increases leukemia cell stiffness. *Blood*. 2007;109(8):3505-3508. doi:10.1182/blood-2006-08-043570
154. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003;72(5):1117-1130. doi:10.1086/375033
155. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7(2):149-156. doi:10.1016/S1470-2045(06)70577-0
156. Gompel A, Santen RJ. Hormone therapy and breast cancer risk 10 years after the WHI. *Climacteric*. 2012;15(3):241-249. doi:10.3109/13697137.2012.666456
157. Asia S, Asia S. Source: Globocan 2018. 2019:2018-2019.
158. Pourteimoor V, Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumor Biol*. 2016;37(11):14479-14499. doi:10.1007/s13277-016-5349-7
159. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*. 2015;82(3-4):142-152. doi:10.1159/000430499
160. Clément F. Regulating human mammary epithelial stem cells transformation : an interplay between extrinsic and intrinsic signals. *http://www.theses.fr*. May 2017.
161. Jena MK, Janjanam J. Role of extracellular matrix in breast cancer development: A brief update [version 2; referees: 2 approved, 1 not approved]. *F1000Research*. 2018;7. doi:10.12688/f1000research.14133.2
162. Nevler A, Shabtai E, Rosin D, Hoffman A, Gutman M, Shabtai M. Mammographic Breast Density as a Predictor of Radiological Findings Requiring Further Investigation. *Isr Med Assoc J*. 2016;18(1):32-35.
163. Abrahamsson A, Rzepecka A, Romu T, et al. Dense breast tissue in postmenopausal women is associated with a pro-inflammatory microenvironment *in vivo*. *Oncoimmunology*. 2016;5(10):e1229723. doi:10.1080/2162402X.2016.1229723
164. Zhang M, Lee A V., Rosen JM. The Cellular Origin and Evolution of Breast Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(3):a027128. doi:10.1101/cshperspect.a027128
165. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1). doi:10.3390/ijms18010197
166. Huels DJ, Sansom OJ. Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;113(1):1-5. doi:10.1038/bjc.2015.214
167. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3722-3727. doi:10.1073/pnas.0915135107
168. Butler SJ, Richardson L, Farias N, Morrison J, Coomber BL. Characterization of cancer stem cell drug resistance in the human colorectal cancer cell lines HCT116 and SW480. *Biochem Biophys*

Res Commun. 2017;490(1):29-35. doi:10.1016/j.bbrc.2017.05.176
169. Rock K, McArdle O, Forde P, et al. A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme - The validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: Has a more radical approach improved survival? *Br J Radiol*. 2012;85(1017). doi:10.1259/bjr/83796755
170. Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes : quels changements ? - Revue Médicale Suisse. https://www.revmed.ch/RMS/2017/RMS-N-579/Nouvelle-classification-OMS-2016-des-gliomes-quels-changements. Accessed January 13, 2020.
171. Zhang SC. Defining glial cells during CNS development. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(11):840-843. doi:10.1038/35097593
172. Bélanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009;11(3):281-296.
173. Picart T, Barritault M, Berthillier J, et al. Characteristics of cerebellar glioblastomas in adults. *J Neurooncol*. 2018;136(3):555-563. doi:10.1007/s11060-017-2682-7
174. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2013;15(SUPPL.2). doi:10.1093/neuonc/not151
175. TAMIMI AF, JUWEID M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: *Glioblastoma*. Codon Publications; 2017:143-153. doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8
176. DEJAEGHER J, VLEESCHOUWER S DE. Recurring Glioblastoma: A Case for Reoperation? In: *Glioblastoma*. Codon Publications; 2017:281-296. doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch14
177. Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol*. 2009;472:323-342. doi:10.1007/978-1-60327-492-0_14
178. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, et al. Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*. 2008;113(7):1953-1968. doi:10.1002/cncr.23741
179. Philips A, Henshaw DL, Lamburn G, O'Carroll MJ. Brain tumours: Rise in glioblastoma multiforme incidence in England 1995-2015 Suggests an Adverse Environmental or Lifestyle Factor. *J Environ Public Health*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/7910754
180. Corle C, Makale M, Kesari S. Cell phones and glioma risk: A review of the evidence. *J Neurooncol*. 2012;106(1):1-13. doi:10.1007/s11060-011-0663-9
181. Yang M, Guo WW, Yang CS, et al. Mobile phone use and glioma risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(5). doi:10.1371/journal.pone.0175136
182. Karipidis K, Elwood M, Benke G, Sanagou M, Tjong L, Croft RJ. Mobile phone use and incidence of brain tumour histological types, grading or anatomical location: A populationbased ecological study. *BMJ Open*. 2018;8(12). doi:10.1136/bmjopen-2018-024489
183. Shergalis A, Bankhead A, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current challenges and opportunities in treating glioblastomas. *Pharmacol Rev*. 2018;70(3):412-445. doi:10.1124/pr.117.014944
184. FERNANDES C, COSTA A, OSÓRIO L, et al. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In: *Glioblastoma*. Codon Publications; 2017:197-241. doi:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch11
185. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(10):4009-4014. doi:10.1073/pnas.1219747110
186. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (80-).* 2014;344(6190):1396-1401. doi:10.1126/science.1254257
187. Nickel GC, Barnholtz-Sloan J, Gould MP, et al. Characterizing mutational heterogeneity in a glioblastoma patient with double recurrence. *PLoS One*. 2012;7(4). doi:10.1371/journal.pone.0035262
188. Meyer M, Reimand J, Lan X, et al. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(3):851-856. doi:10.1073/pnas.1320611111

189. Qazi MA, Vora P, Venugopal C, et al. Intratumoral heterogeneity: Pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol*. 2017;28(7):1448-1456. doi:10.1093/annonc/mdx169
190. Chen J, Li Y, Yu TS, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012;488(7412):522-526. doi:10.1038/nature11287
191. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401. doi:10.1038/nature03128
192. Lottaz C, Beier D, Meyer K, et al. Transcriptional profiles of CD133+ and C. *Cancer Res*. 70(5):2030-2040.
193. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. Glioblastoma stem-like cells: At the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis*. 2014;36(2):177-185. doi:10.1093/carcin/bgu243
194. Lathia JD, Heddleston JM, Venere M, Rich JN. Deadly teamwork: Neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell Stem Cell*. 2011;8(5):482-485. doi:10.1016/j.stem.2011.04.013
195. A. C, H. A. Glioma Stem Cells: Cell Culture, Markers and Targets for New Combination Therapies. In: *Cancer Stem Cells Theories and Practice*. InTech; 2011. doi:10.5772/13626
196. Xie Q, Flavahan WA, Bao S, Rich J. The tailless root of glioma: Cancer stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):114-116. doi:10.1016/j.stem.2014.07.004
197. Brescia P. Identification of Glioma Stem Cells: What is Already Known and How Far do We Still Need to Go? The Biomarkers Dilemma. *J Carcinog Mutagen*. 2012;s1(01). doi:10.4172/2157-2518.s1-003
198. Godek KM, Venere M, Wu Q, et al. Chromosomal instability affects the tumorigenicity of glioblastoma tumor-initiating cells. *Cancer Discov*. 2016;6(5):532-545. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1154
199. Piccirillo SGM, Colman S, Potter NE, et al. Genetic and functional diversity of propagating cells in glioblastoma. *Stem Cell Reports*. 2015;4(1):7-15. doi:10.1016/j.stemcr.2014.11.003
200. McCord AM, Jamal M, Shankavarum UT, Lang FF, Camphausen K, Tofilon PJ. Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol Cancer Res*. 2009;7(4):489-497. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0360
201. Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: Lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell*. 2012;149(1):36-47. doi:10.1016/j.cell.2012.03.009
202. Filatova A, Acker T, Garvalov BK. The cancer stem cell niche(s): The crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2013;1830(2):2496-2508. doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.008
203. Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM, et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*. 2014;157(3):580-594. doi:10.1016/j.cell.2014.02.030
204. Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death Differ*. 2011;18(5):829-840. doi:10.1038/cdd.2010.150
205. Ana, Balbous. Caract□risation des cellules souches de glioblastomes : nouvelles approches th□rapeutiques. 2014.
206. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, et al. Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell*. 2009;15(1):45-56. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.006
207. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *N Engl J Med*. 2005;353(8):811-822. doi:10.1056/NEJMra043666
208. Persson AI, Petritsch C, Swartling FJ, et al. Non-Stem Cell Origin for Oligodendroglioma. *Cancer Cell*. 2010;18(6):669-682. doi:10.1016/j.ccr.2010.10.033
209. The origins of glioma | Nature Reviews Cancer. https://www-nature-com.docelec.univ-lyon1.fr/articles/nrc3129. Accessed January 13, 2020.
210. Llaguno SRA, Parada LF. Cell of origin of glioma: Biological and clinical implications. *Br J Cancer*. 2016;115(12):1445-1450. doi:10.1038/bjc.2016.354

211. McIlvain G, Schwarb H, Cohen NJ, Telzer EH, Johnson CL. Mechanical properties of the in vivo adolescent human brain. *Dev Cogn Neurosci*. 2018;34:27-33. doi:10.1016/j.dcn.2018.06.001
212. Gangatharan G, Schneider-Maunoury S, Breau MA. Role of mechanical cues in shaping neuronal morphology and connectivity. *Biol Cell*. 2018;110(6):125-136. doi:10.1111/boc.201800003
213. Koser DE, Thompson AJ, Foster SK, et al. Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci*. 2016;19(12):1592-1598. doi:10.1038/nn.4394
214. Seano G, Nia HT, Emblem KE, et al. Solid stress in brain tumours causes neuronal loss and neurological dysfunction and can be reversed by lithium. *Nat Biomed Eng*. 2019;3(3):230-245. doi:10.1038/s41551-018-0334-7
215. Chauvet D, Imbault M, Capelle L, et al. In Vivo Measurement of Brain Tumor Elasticity Using Intraoperative Shear Wave Elastography. *Ultraschall der Medizin - Eur J Ultrasound*. 2015;37(06):584-590. doi:10.1055/s-0034-1399152
216. Ciasca G, Sassun TE, Minelli E, et al. Nano-mechanical signature of brain tumours. *Nanoscale*. 2016;8(47):19629-19643. doi:10.1039/c6nr06840e
217. Miroshnikova YA, Mouw JK, Barnes JM, et al. Tissue mechanics promote IDH1-dependent HIF1α-tenascin C feedback to regulate glioblastoma aggression. *Nat Cell Biol*. 2016;18(12):1336-1345. doi:10.1038/ncb3429
218. Barnes JM, Kaushik S, Bainer RO, et al. A tension-mediated glycocalyx–integrin feedback loop promotes mesenchymal-like glioblastoma. *Nat Cell Biol*. 2018;20(10):1203-1214. doi:10.1038/s41556-018-0183-3
219. Umesh V, Rape AD, Ulrich TA, Kumar S. Microenvironmental stiffness enhances glioma cell proliferation by stimulating epidermal growth factor receptor signaling. *PLoS One*. 2014;9(7). doi:10.1371/journal.pone.0101771
220. Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The Mechanical Rigidity of the Extracellular Matrix Regulates the Structure, Motility, and Proliferation of Glioma Cells. *Cancer Res*. 2009;69(10).
221. Bangasser BL, Shamsan GA, Chan CE, et al. Shifting the optimal stiffness for cell migration. *Nat Commun*. 2017;8. doi:10.1038/ncomms15313
222. Thomas TW, DiMilla PA. Spreading and motility of human glioblastoma cells on sheets of silicone rubber depend on substratum compliance. *Med Biol Eng Comput*. 2000;38(3):360-370. doi:10.1007/BF02347059
223. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol*. 2005;23(10):2411-2422. doi:10.1200/JCO.2005.03.089
224. Grundy TJ, De Leon E, Griffin KR, et al. Differential response of patient-derived primary glioblastoma cells to environmental stiffness. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep23353
225. Wong SY, Ulrich TA, Deleyrolle LP, et al. Constitutive activation of myosin-dependent contractility sensitizes glioma tumor-initiating cells to mechanical inputs and reduces tissue invasion. *Cancer Res*. 2015;75(6):1113-1122. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3426
226. Ruiz-Ontañon P, Orgaz JL, Aldaz B, et al. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells*. 2013;31(6):1075-1085. doi:10.1002/stem.1349
227. Monzo P, Chong YK, Guetta-Terrier C, et al. Mechanical confinement triggers glioma linear migration dependent on formin FHOD3. *Mol Biol Cell*. 2016;27(8):1246-1261. doi:10.1091/mbc.E15-08-0565
228. De Witt Hamer PC, Van Tilborg AAG, Eijk PP, et al. The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids. *Oncogene*. 2008;27(14):2091-2096. doi:10.1038/sj.onc.1210850
229. Lagadec C, Vlashi E, Bhuta S, et al. Tumor cells with low proteasome subunit expression predict overall survival in head and neck cancer patients. *BMC Cancer*. 2014;14(1):1-11. doi:10.1186/1471-2407-14-152
230. Lenos KJ, Vermeulen L. Cancer stem cells don't waste their time cleaning-low proteasome activity, a marker for cancer stem cell function. *Ann Transl Med*. 2016;4(24).

doi:10.21037/atm.2016.11.81
231. Berabez N. Caractérisation des cellules souches du glioblastome : identification de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation de leur transcriptome. *http://www.theses.fr*. December 2018.
232. Berthier E, Young EWK, Beebe D. Engineers are from PDMS-land, biologists are from polystyrenia. *Lab Chip*. 2012;12(7):1224-1237. doi:10.1039/c2lc20982a
233. van Meer BJ, de Vries H, Firth KSA, et al. Small molecule absorption by PDMS in the context of drug response bioassays. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482(2):323-328. doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.062
234. Toepke MW, Beebe DJ. *PDMS Absorption of Small Molecules and Consequences in Microfluidic Applications*. Vol 6. Royal Society of Chemistry; 2006:1484-1486. doi:10.1039/b612140c
235. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(2):108-122. doi:10.1038/nrc2544
236. Cosson S, Lutolf MP. Hydrogel microfluidics for the patterning of pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2015;4(1):4462. doi:10.1038/srep04462
237. Aymard P, Martin DR, Plucknett K, Foster TJ, Clark AH, Norton IT. Influence of thermal history on the structural and mechanical properties of agarose gels. *Biopolymers*. 2001;59(3):131-144. doi:10.1002/1097-0282(200109)59:3<131::AID-BIP1013>3.0.CO;2-8
238. Zarrintaj P, Manouchehri S, Ahmadi Z, et al. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2018;187:66-84. doi:10.1016/J.CARBPOL.2018.01.060
239. De Freitas PS, Wirz D, Stolz M, Göpfert B, Friederich NF, Daniels AU. Pulsatile dynamic stiffness of cartilage-like materials and use of agarose gels to validate mechanical methods and models. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2006;78(2):347-357. doi:10.1002/jbm.b.30494
240. Buckley CT, Thorpe SD, O'Brien FJ, Robinson AJ, Kelly DJ. The effect of concentration, thermal history and cell seeding density on the initial mechanical properties of agarose hydrogels. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009;2(5):512-521. doi:10.1016/j.jmbbm.2008.12.007
241. Cheng S-Y, Heilman S, Wasserman M, Archer S, Shuler ML, Wu M. A hydrogel-based microfluidic device for the studies of directed cell migration. *Lab Chip*. 2007;7(6):763-769. doi:10.1039/b618463d
242. Haessler U, Pisano M, Wu M, Swartz M a. Dendritic cell chemotaxis in 3D under defined chemokine gradients reveals differential response to ligands CCL21 and CCL19. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(14):5614-5619. doi:10.1073/pnas.1014920108
243. Haessler U, Kalinin Y, Swartz M a, Wu M. An agarose-based microfluidic platform with a gradient buffer for 3D chemotaxis studies. *Biomed Microdevices*. 2009;11(4):827-835. doi:10.1007/s10544-009-9299-3
244. Kalli M, Voutouri C, Minia A, et al. Mechanical Compression Regulates Brain Cancer Cell Migration Through MEK1/Erk1 Pathway Activation and GDF15 Expression. *Front Oncol*. 2019;9(SEP):992. doi:10.3389/fonc.2019.00992
245. Rizzuti I, Mascheroni P, Arcucci S, et al. Mechanical-control of cell proliferation increases resistance to chemotherapeutic agents. *bioRxiv*. January 2020:1-6. doi:https://doi.org/10.1101/2020.01.18.910554
246. Pfeifer CR, Xia Y, Zhu K, et al. Constricted migration increases DNA damage and independently represses cell cycle. *Mol Biol Cell*. 2018;29(16):1948-1962. doi:10.1091/mbc.E18-02-0079
247. Shin JW, Buxboim A, Spinler KR, et al. Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2014;14(1):81-93. doi:10.1016/j.stem.2013.10.009
248. Xia Y, Pfeifer CR, Zhu K, et al. Rescue of DNA damage after constricted migration reveals a mechano-regulated threshold for cell cycle. *J Cell Biol*. 2019;218(8):2545-2563. doi:10.1083/jcb.201811100
249. Ramser K, Hanstorp D. Optical manipulation for single-cell studies. *J Biophotonics*. 2010;3(4):187-206. doi:10.1002/jbio.200910050
250. Guck J, Schinkinger S, Lincoln B, et al. Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence. *Biophys J*. 2005;88(5):3689-3698.

doi:10.1529/biophysj.104.045476
251. Wang N, Butler JP, Ingber DE. 10.1126@Science.7684161. 1993;260(May):1124-1128.
252. Thoumine O, Ott A, Cardoso O, Meister J-J. Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *J Biochem Biophys Methods*. 1999;39(1-2):47-62. doi:10.1016/S0165-022X(98)00052-9
253. Thoumine O, Ott A. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci*. 1997;110(17):2109-2116.
254. Terenna CR, Makushok T, Velve-Casquillas G, et al. Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape in fission yeast. *Curr Biol*. 2008;18(22):1748-1753. doi:10.1016/j.cub.2008.09.047
255. Vargas P, Chabaud M, Thiam HR, Lankar D, Piel M, Lennon-Dumenil AM. Study of dendritic cell migration using micro-fabrication. *J Immunol Methods*. 2016;432:30-34. doi:10.1016/j.jim.2015.12.005
256. Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, et al. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. 2012;109(3). doi:10.1073/pnas.1118910109
257. Kittur H, Weaver W, Di Carlo D. Well-plate mechanical confinement platform for studies of mechanical mutagenesis. *Biomed Microdevices*. 2014;16(3):439-447. doi:10.1007/s10544-014-9846-4
258. Le Berre M, Aubertin J, Piel M. Fine control of nuclear confinement identifies a threshold deformation leading to lamina rupture and induction of specific genes. *Integr Biol (United Kingdom)*. 2012;4(11):1406-1414. doi:10.1039/c2ib20056b
259. Liu YJ, Le Berre M, Lautenschlaeger F, et al. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell*. 2015;160(4):659-672. doi:10.1016/j.cell.2015.01.007
260. Le Berre M, Zlotek-Zlotkiewicz E, Bonazzi D, Lautenschlaeger F, Piel M. Methods for two-dimensional cell confinement. *Methods Cell Biol*. 2014;121:213-229. doi:10.1016/B978-0-12-800281-0.00014-2
261. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Stress Induce Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand Up-Regulation via Prostaglandin E2 Synthesis. *J Bone Miner Res*. 2002;17(2):210-220. doi:10.1359/jbmr.2002.17.2.210
262. Chen Q, Yang D, Zong H, et al. Growth-induced stress enhances epithelial-mesenchymal transition induced by IL-6 in clear cell renal cell carcinoma via the Akt/GSK-3β/β-catenin signaling pathway. *Oncogenesis*. 2017;6(8):e375-e375. doi:10.1038/oncsis.2017.74
263. StagePresser™. https://www.flexcellint.com/product/stagepresser. Accessed February 21, 2020.
264. Cell confinement – 4Dcell. https://www.4dcell.com/cell-culture-systems/cell-confinement/. Accessed February 21, 2020.
265. Si F, Li B, Margolin W, Sun SX. Bacterial growth and form under mechanical compression. *Sci Rep*. 2015;5. doi:10.1038/srep11367
266. Fukui Y, Yumura S, Yumura TK. Agar-Overlay Immunofluorescence: High-Resolution Studies of Cytoskeletal Components and Their Changes during Chemotaxis. *Methods Cell Biol*. 1987;28(C):347-356. doi:10.1016/S0091-679X(08)61655-6
267. Aureille J, Buffière-Ribot V, Harvey BE, et al. Nuclear envelope deformation controls cell cycle progression in response to mechanical force. *EMBO Rep*. 2019;20(9). doi:10.15252/embr.201948084
268. Srivastava N, Kay RR, Kabla AJ. Method to study cell migration under uniaxial compression. *Mol Biol Cell*. 2017;28(6):809-816. doi:10.1091/mbc.E16-08-0575
269. Srivastava N, Traynor D, Piel M, Kabla AJ, Kay RR. Pressure sensing through Piezo channels controls whether cells migrate with blebs or pseudopods. *Proc Natl Acad Sci*. 2020;117(5):201905730. doi:10.1073/pnas.1905730117
270. Cadart C, Zlotek-Zlotkiewicz E, Le Berre M, Piel M, Matthews HK. Exploring the Function of Cell Shape and Size during Mitosis. *Dev Cell*. 2014;29(2):159-169. doi:10.1016/J.DEVCEL.2014.04.009
271. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*.

2004;4(9):677-687. doi:10.1038/nrc1430
272. Li Q, Kumar A, Makhija E, Shivashankar G V. The regulation of dynamic mechanical coupling between actin cytoskeleton and nucleus by matrix geometry. *Biomaterials*. 2014;35(3):961-969. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.10.037
273. Kim DH, Wirtz D. Cytoskeletal tension induces the polarized architecture of the nucleus. *Biomaterials*. 2015;48:161-172. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.01.023
274. Seo HR, Joo HJ, Kim DH, et al. Nanopillar Surface Topology Promotes Cardiomyocyte Differentiation through Cofilin-Mediated Cytoskeleton Rearrangement. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(20):16803-16812. doi:10.1021/acsami.7b01555
275. Mazumder A, Shivashankar G V. Gold-nanoparticle-assisted laser perturbation of chromatin assembly reveals unusual aspects of nuclear architecture within living cells. *Biophys J*. 2007;93(6):2209-2216. doi:10.1529/biophysj.106.102202
276. Lee J-H, Kim D-H, Lee H-H, Kim H-W. Role of nuclear mechanosensitivity in determining cellular responses to forces and biomaterials. *Biomaterials*. 2019;197:60-71. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.01.010
277. Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: Regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet*. 2007;8(2):104-115. doi:10.1038/nrg2041
278. Gruenbaum Y, Foisner R. Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annu Rev Biochem*. 2015;84(1):131-164. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034115
279. Ramdas NM, Shivashankar G V. Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin o1rganization. *J Mol Biol*. 2015;427(3):695-706. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.008
280. Lee JY, Chang JK, Dominguez AA, et al. YAP-independent mechanotransduction drives breast cancer progression. *Nat Commun*. 2019;10(1):1848. doi:10.1038/s41467-019-09755-0
281. Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011;474(7350):179-183. doi:10.1038/nature10137
282. Nakajima H, Yamamoto K, Agarwala S, et al. Flow-Dependent Endothelial YAP Regulation Contributes to Vessel Maintenance. *Dev Cell*. 2017;40(6):523-536.e6. doi:10.1016/j.devcel.2017.02.019
283. Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, et al. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*. 2017;171(6):1397-1410.e14. doi:10.1016/j.cell.2017.10.008
284. Aragona M, Panciera T, Manfrin A, et al. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*. 2013;154(5):1047-1059. doi:10.1016/j.cell.2013.07.042
285. Rianna C, Radmacher M, Kumar S. Direct Evidence that Tumor Cells Soften when Navigating Confined Spaces. *Mol Biol Cell*. 2020:In press.
286. He L, Tao J, Maity D, et al. Role of membrane-tension gated Ca 2+ flux in cell mechanosensation. *J Cell Sci*. 2018;131(4). doi:10.1242/jcs.208470
287. Moriyama K, Hori T. BCR-ABL induces tyrosine phosphorylation of YAP leading to expression of Survivin and Cyclin D1 in chronic myeloid leukemia cells. *Int J Hematol*. 2019;110(5):591-598. doi:10.1007/s12185-019-02726-7
288. Chorzalska A, Kim JF, Roder K, et al. Long-Term Exposure to Imatinib Mesylate Downregulates Hippo Pathway and Activates YAP in a Model of Chronic Myelogenous Leukemia. *Stem Cells Dev*. 2017;26(9):656-677. doi:10.1089/scd.2016.0262
289. Cai D, Feliciano D, Dong P, et al. Phase separation of YAP reorganizes genome topology for long-term YAP target gene expression. *Nat Cell Biol*. 2019;21(12):1578-1589. doi:10.1038/s41556-019-0433-z
290. McGrail DJ, Mcandrews KM, Brandenburg CP, et al. Osmotic Regulation Is Required for Cancer Cell Survival under Solid Stress. 2015;109(7):1334-1337. doi:10.1016/j.bpj.2015.07.046
291. Rianna C, Radmacher M. Comparison of viscoelastic properties of cancer and normal thyroid cells

on different stiffness substrates. *Eur Biophys J*. 2017;46(4):309-324. doi:10.1007/s00249-016-1168-4

292. Laperrousaz B, Jeanpierre S, Sagorny K, et al. Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood*. 2013;122(23):3767-3777. doi:10.1182/blood-2013-05-501460
293. Grockowiak E, Laperrousaz B, Jeanpierre S, et al. Immature CML cells implement a BMP autocrine loop to escape TKI treatment. *Blood*. 2017;130(26):2860-2871. doi:10.1182/blood-2017-08-801019
294. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*. 2016;163:94-108. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013
295. Allensworth JL, Evans MK, Bertucci F, et al. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Mol Oncol*. 2015;9(6):1155-1168. doi:10.1016/j.molonc.2015.02.007
296. Lawrenson K, Grun B, Gayther SA. Heterotypic three-dimensional in vitro modeling of stromal-epithelial interactions during ovarian cancer initiation and progression. *J Vis Exp*. 2012;(66). doi:10.3791/4206
297. Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods*. 2007;4(4):359-365. doi:10.1038/nmeth1015
298. Rodday B, Hirschhaeuser F, Walenta S, Mueller-Klieser W. Semiautomatic growth analysis of multicellular tumor spheroids. *J Biomol Screen*. 2011;16(9):1119-1124. doi:10.1177/1087057111419501
299. Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity. *Nat Med*. 1998;4(8):901-907. doi:10.1038/nm0898-901
300. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nat Protoc*. 2009;4(3):309-324. doi:10.1038/nprot.2008.226
301. Vinci M, Gowan S, Boxall F, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol*. 2012;10. doi:10.1186/1741-7007-10-29
302. Virgone-Carlotta A, Lemasson M, Mertani HC, et al. In-depth phenotypic characterization of multicellular tumor spheroids: Effects of 5-Fluorouracil. *PLoS One*. 2017;12(11). doi:10.1371/journal.pone.0188100
303. Singh M, Close DA, Mukundan S, Johnston PA, Sant S. Production of uniform. *Assay Drug Dev Technol*. 2015;13(9):570-583. doi:10.1089/adt.2015.662
304. Lee JM, Park DY, Yang L, et al. Generation of uniform-sized multicellular tumor spheroids using hydrogel microwells for advanced drug screening. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-10. doi:10.1038/s41598-018-35216-7
305. Ungrin MD, Joshi C, Nica A, Bauwens C, Zandstra PW. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One*. 2008;3(2). doi:10.1371/journal.pone.0001565
306. Razian G, Yu Y, Ungrin M. Production of large numbers of size-controlled tumor spheroids using microwell plates. *J Vis Exp*. 2013;(81). doi:10.3791/50665
307. AggreWell™800 | STEMCELL Technologies. https://www.stemcell.com/products/aggrewell800.html. Accessed January 13, 2020.
308. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*. 2003;83(2):173-180. doi:10.1002/bit.10655
309. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 2011;136(3):473-478. doi:10.1039/c0an00609b
310. (No Title). http://3dbiomatrix.com/. Accessed January 13, 2020.
311. Tsoy AM, Zaytseva-Zotova DS, Edelweiss EF, et al. Microencapsulated multicellular tumor spheroids as a novel in vitro model for drug screening. *Biochem Suppl Ser B Biomed Chem*.

2010;4(3):243-250. doi:10.1134/S1990750810030054
312. Alessandri K. The cellular capsules technology and its applications to investigate model tumor progression and to engineer tissues in vitro. *Http://WwwThesesFr*. 2013:1-121.
313. Mendes AC, Baran ET, Lisboa P, Reis RL, Azevedo HS. Microfluidic fabrication of self-assembled peptide-polysaccharide microcapsules as 3D environments for cell culture. *Biomacromolecules*. 2012;13(12):4039-4048. doi:10.1021/bm301332z
314. Chan HF, Zhang Y, Ho YP, Chiu YL, Jung Y, Leong KW. Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment. *Sci Rep*. 2013;3. doi:10.1038/srep03462
315. Souza GR, Molina JR, Raphael RM, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol*. 2010;5(4):291-296. doi:10.1038/nnano.2010.23
316. Ino K, Ito A, Honda H. Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(5):1309-1317. doi:10.1002/bit.21322
317. Liu J, Kuznetsova LA, Edwards GO, et al. Functional three-dimensional HepG2 aggregate cultures generated from an ultrasound trap: Comparison with HepG2 spheroids. *J Cell Biochem*. 2007;102(5):1180-1189. doi:10.1002/jcb.21345
318. Sebastian A, Buckle A-MM, Markx GH. Tissue engineering with electric fields: Immobilization of mammalian cells in multilayer aggregates using dielectrophoresis. *Biotechnol Bioeng*. 2007;98(3):694-700. doi:10.1002/bit.21416
319. Khoury M, Bransky A, Korin N, et al. A microfluidic traps system supporting prolonged culture of human embryonic stem cells aggregates. *Biomed Microdevices*. 2010;12(6):1001-1008. doi:10.1007/s10544-010-9454-x
320. Patra B, Peng CC, Liao WH, Lee CH, Tung YC. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep21061
321. Sabhachandani P, Motwani V, Cohen N, Sarkar S, Torchilin V, Konry T. Generation and functional assessment of 3D multicellular spheroids in droplet based microfluidics platform. *Lab Chip*. 2016;16(3):497-505. doi:10.1039/c5lc01139f
322. Sart S, Tomasi RFX, Amselem G, Baroud CN. Multiscale cytometry and regulation of 3D cell cultures on a chip. *Nat Commun*. 2017;8(1). doi:10.1038/s41467-017-00475-x
323. Ota H, Kodama T, Miki N. Rapid formation of size-controlled three dimensional hetero-cell aggregates using micro-rotation flow for spheroid study. *Biomicrofluidics*. 2011;5(3). doi:10.1063/1.3609969
324. Hsiao AY, Torisawa Y suke, Tung YC, et al. Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials*. 2009;30(16):3020-3027. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.047
325. Torisawa Y suke, Takagi A, Nashimoto Y, Yasukawa T, Shiku H, Matsue T. A multicellular spheroid array to realize spheroid formation, culture, and viability assay on a chip. *Biomaterials*. 2007;28(3):559-566. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.054
326. Kwapiszewska K, Michalczuk A, Rybka M, Kwapiszewski R, Brzózka Z. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. *Lab Chip*. 2014;14(12):2096-2104. doi:10.1039/c4lc00291a
327. Gong X, Lin C, Cheng J, et al. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. Kerkis I, ed. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130348. doi:10.1371/journal.pone.0130348
328. Mirab F, Kang YJ, Majd S. Preparation and characterization of size-controlled glioma spheroids using agarose hydrogel microwells. *PLoS One*. 2019;14(1):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0211078
329. 3D Petri Dish by Microtissues, Inc. https://www.microtissues.com/. Accessed January 13, 2020.
330. Susaki EA, Ueda HR. Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals. *Cell Chem Biol*. 2016;23(1):137-157. doi:10.1016/j.chembiol.2015.11.009

331. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 1969;137(4):433-457.
332. Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: Implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10(1):75-86. doi:10.1007/s10911-005-2542-5
333. Shaheen S, Ahmed M, Lorenzi F, Nateri AS. Spheroid-Formation (Colonosphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Rev Reports*. 2016;12(4):492-499. doi:10.1007/s12015-016-9664-6
334. Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett*. 2008;272(2):177-185. doi:10.1016/j.canlet.2008.05.029
335. Munevar S, Wang Y, Dembo M. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J*. 2001;80(4):1744-1757.
336. Pushkarsky I, Tseng P, Black D, et al. Elastomeric sensor surfaces for high-throughput single-cell force cytometry. *Nat Biomed Eng*. 2018;2(2):124-137. doi:10.1038/s41551-018-0193-2
337. Resto-Irizarry AM, Fu J. Highly parallel single-cell force cytometry. *Nat Biomed Eng*. 2018;2(2):60-61. doi:10.1038/s41551-018-0198-x
338. Colin-York H, Eggeling C, Fritzsche M. Dissection of mechanical force in living cells by super-resolved traction force microscopy. *Nat Protoc*. 2017;12(4):783-796. doi:10.1038/nprot.2017.009
339. Holenstein CN, Silvan U, Snedeker JG. High-resolution traction force microscopy on small focal adhesions-Improved accuracy through optimal marker distribution and optical flow tracking. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/srep41633
340. Han SJ, Oak Y, Groisman A, Danuser G. Traction microscopy to identify force modulation in subresolution adhesions. *Nat Methods*. 2015;12(7):653-656. doi:10.1038/nmeth.3430
341. Delanoë-Ayari H, Rieu JP, Sano M. 4D Traction Force Microscopy Reveals Asymmetric Cortical Forces in Migrating *Dictyostelium* Cells. *Phys Rev Lett*. 2010;105(24):248103. doi:10.1103/PhysRevLett.105.248103
342. Huang J, Wang L, Xiong C, Yuan F. Elastic hydrogel as a sensor for detection of mechanical stress generated by single cells grown in three-dimensional environment. *Biomaterials*. 2016;98:103-112. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.04.024
343. Steinwachs J, Metzner C, Skodzek K, et al. Three-dimensional force microscopy of cells in biopolymer networks. *Nat Methods*. 2016;13(2):171-176. doi:10.1038/nmeth.3685
344. Uroz M, Wistorf S, Serra-Picamal X, et al. Regulation of cell cycle progression by cell–cell and cell–matrix forces. *Nat Cell Biol*. 2018;20(6):646-654. doi:10.1038/s41556-018-0107-2
345. Mohagheghian E, Luo J, Chen JJ, et al. Quantifying compressive forces between living cell layers and within tissues using elastic round microgels. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-04245-1
346. Bouguet J, Bouguet J. Pyramidal implementation of the Lucas Kanade feature tracker. *INTEL Corp Microprocess Res LABS*. 2000.
347. Landau LD, Lifshitz EM, Kosevich AM, Pitaevskii LP, Sykes JB, Reid WH. Course of Theoretical Physics, vol. 7 - Theory of Elasticity. 1986;7:195.
348. Monnier S, Delarue M, Brunel B, Dolega ME, Delon A, Cappello G. Effect of an osmotic stress on multicellular aggregates. *Methods*. 2016;94:114-119. doi:10.1016/j.ymeth.2015.07.009
349. El-Nachef D, Shi K, Beussman KM, et al. A Rainbow Reporter Tracks Single Cells and Reveals Heterogeneous Cellular Dynamics among Pluripotent Stem Cells and their Differentiated Derivatives. *bioRxiv*. January 2020:2020.01.08.896290. doi:10.1101/2020.01.08.896290
350. Lai P-L, Chen T-C, Feng C-Y, et al. Selection of a Malignant Subpopulation from a Colorectal Cancer Cell Line. 2019;(1). doi:10.1101/578823
351. Lin D, Li P, Feng J, et al. Screening Therapeutic Agents Specific to Breast Cancer Stem Cells Using a Microfluidic Single-Cell Clone-Forming Inhibition Assay. *Small*. April 2019:1901001. doi:10.1002/smll.201901001
352. Pang L, Ding J, Ge Y, Fan J, Fan S-KK. Single-Cell-Derived Tumor-Sphere Formation and Drug-

Resistance Assay Using an Integrated Microfluidics. *Anal Chem*. 2019;91(13):8318-8325. doi:10.1021/acs.analchem.9b01084

353. Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, et al. Enumeration of Neural Stem and Progenitor Cells in the Neural Colony-Forming Cell Assay. *Stem Cells*. 2008;26(4):988-996. doi:10.1634/stemcells.2007-0867
354. Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres - Re-evaluating the relationship. *Nat Methods*. 2005;2(5):333-336. doi:10.1038/nmeth758
355. Prunet A, Lefort S, Delanoë-Ayari H, et al. Development of a soft cell confiner to decipher the impact of mechanical stimuli on cells. *bioRxiv*. January 2020:2020.01.04.892695. doi:10.1101/2020.01.04.892695
356. Giraud J, Failla LM, Pascussi JM, et al. Autocrine secretion of progastrin promotes the survival and self-renewal of colon cancer stem-like cells. *Cancer Res*. 2016;76(12):3618-3628. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1497
357. Millard M, Yakavets I, Zorin V, Kulmukhamedova A, Marchal S, Bezdetnaya L. Drug delivery to solid tumors: the predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:7993-8007. doi:10.2147/IJN.S146927
358. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells-what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):497-512. doi:10.1038/nrd4253
359. Madl CM, Heilshorn SC. Engineering Hydrogel Microenvironments to Recapitulate the Stem Cell Niche. *Annu Rev Biomed Eng*. 2018;20(1):21-47. doi:10.1146/annurev-bioeng-062117-120954
360. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(11):669-682. doi:10.1038/nri3902
361. Matamoro-Vidal A, Levayer R. Multiple Influences of Mechanical Forces on Cell Competition. *Curr Biol*. 2019;29(15):R762-R774. doi:10.1016/j.cub.2019.06.030
362. Basan M, Risler T, Joanny J-F, Sastre-Garau X, Prost J. Homeostatic competition drives tumor growth and metastasis nucleation. *HFSP J*. 2009;3(4):265-272. doi:10.2976/1.3086732

Résumé

Un des enjeux actuels majeurs dans la recherche contre le cancer est la rechute induite par la résistance aux anti-cancéreux, notamment d'une sous population cellulaire présentant une plasticité importante. Au cours de l'évolution tumorale, l'environnement présente d'importantes modifications biochimiques mais également de ses propriétés mécaniques. Les cellules cancéreuses et les cellules du stroma, subissent des variations majeures des forces physiques qu'elles subissent : soit une augmentation importante due à une croissance rapide dans un espace fini, soit une diminution très importante lors d'un éventuel traitement anticancéreux. Ce phénomène n'est certainement pas sans conséquence pour le tissu concerné. Si l'effet du changement de rigidité de la matrice est largement étudié, un nombre d'étude assez limité s'intéresse aux rôles des différentes contraintes mécaniques. L'objectif principal a donc été d'élaborer des microsystèmes permettant d'étudier l'impact à long terme de ces signaux mécaniques : d'abord en 2D puis en 3D. Les outils ont été élaborés en agarose, hydrogel naturel qui présente plusieurs avantages pour une utilisation en culture cellulaire et permet de garder des conditions physiologiques.

Le premier système conçu permet d'appliquer un confinement contrôlé sur une population de cellules en deux dimensions. Différentes applications ont été testées : des observations dynamiques en microscopie, des immunomarquages, des analyses moléculaires ou du criblage thérapeutique. Nous avons montré qu'il était tout à fait adapté à des analyses à long terme et qu'aucune différence de viabilité ou de prolifération n'est induite par le système en lui-même ; même après plusieurs jours. Une baisse de prolifération sous contrainte mécanique a été observée pour des cellules cancéreuses mais aussi pour des cellules issues du stroma et a été attestée par différentes techniques. Ensuite, des analyses de signalétiques ont été initiées, notamment concernant un facteur de transcription YAP (Yes-associated-Protein) : élément clefs de diverses voies de signalisation essentielles.

La culture cellulaire en trois dimensions et le sphéroïde (agrégat multicellulaire) est de plus en plus utilisé notamment comme modèle de tumeurs solides. Cependant une production homogène et reproductible n'est pas toujours aisée. Le microsystème développé permet de produire plus d'une centaine de sphéroïdes par un seul pipetage et permet une compatibilité avec la microscopie à haute résolution. Deux techniques ont ensuite été testées pour appliquer des contraintes sur les agrégats : une pression osmotique et le confinement dans une matrice d'agarose à rigidité ajustable. Une technique d'analyses d'images par suivi des déplacements de microsphères a permis de remonter aux forces induites par la croissance du sphéroïde mais a aussi montré un comportement non élastique de l'agarose à plus fortes déformations.

Abstract

One major issue in fighting against cancer relapse is the resistance to therapeutic treatment of some specific cells inside tumors which present an important plasticity and dependence on their microenvironment. During tumour progression, many changes in the physical properties of the microenvironment can occur such as the apparition of compressive stresses due to proliferation burst or increase in the microenvironment stiffness. While the effect of matrix stiffness has been extensively studied in the context of tumor progression and resistance to treatment, limited studies have focused on the role of solid stresses. Indeed, the field is lacking standard *in vitro* test reproducing this long-term compression, without affecting cells behavior by other means. The major objectives of this project were to develop hydrogel-based microsystems close to physiological conditions and which permit to keep cells several days in culture. Agarose, which present several important advantages for cell culture, was chosen.

The first system was developed to apply controlled compression on a population of 2D cells. Different applications were tested: time-lapse microscopy, *in-situ* immunofluorescence, post molecular analyses confinement and drug testing. We have showed with different techniques, that proliferation is reduced under confinement for cancerous cells but also stroma cells. We also began to study some important signaling pathways under confinement and we showed that YAP (Yes-Associated-Protein), which is a key parameter for different essential pathway, is disturbed under mechanical confinement.

The use of 3D cell culture is increasing and particularly to model solid tumors but the tools used for their production are not always easy, reproducible and compatible with high resolution microscopy. We designed a microsystem directly compatible with microscopy which permits to create rapidly hundreds of homogeneous spheroids. We then tried to apply constraints on aggregates by osmotic pressure or with confinement in agarose gel. Image analyses of tracking were used to follow fluorescent microspheres in the gel; forces due to spheroid growth were quantified for small displacements and permit to detect non elastic behavior of agarose for larger deformations.