

Effets du bêta-sitostérol sur des modèles biomimétiques de la membrane plasmique de cellules cancéreuses.

Auteur : Goret, Amélie

Promoteur(s) : Deleu, Magali

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/24109>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

EFFETS DU BÊTA-SITOSTÉROL SUR DES MODÈLES BIOMIMÉTIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES CANCÉREUSES

AMÉLIE GORET

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2024-2025

PROMOTEUR :MAGALI DELEU

©Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech. Le présent document n'engage que son auteur.

EFFETS DU BÊTA-SITOSTÉROL SUR DES MODÈLES BIOMIMÉTIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES CANCÉREUSES

AMÉLIE GORET

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2024-2025

PROMOTEUR :MAGALI DELEU

Ce travail de fin d'études a été réalisé au sein du Laboratoire de biophysique moléculaire aux interfaces (LBMI ; Gembloux Agro-Bio Tech, ULiège)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à ma promotrice, la Professeure Magali Deleu, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon travail de fin d'études au sein du laboratoire de biophysique moléculaire aux interfaces mais également pour sa disponibilité, sa bienveillance et la qualité de son encadrement.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à Manon Genva, première assistante, pour tout le temps consacré et l'aide apportée lors de l'utilisation de l'UHPLC MS/MS à triple quadrupôle.

Je souhaite également remercier Catherine, technicienne du laboratoire de biophysique moléculaire aux interfaces pour son aide, ses conseils précieux et sa bonne humeur. J'adresse aussi mes remerciements à toutes les personnes présentes au sein du bureau, Anaïs, Thomas et Jean-Rock pour l'instauration d'une ambiance chaleureuse mais également aux deux autres TFistes, Léa et Florence pour l'entraide et le soutien.

Mes remerciements vont également à mes parents, qui ont toujours été présents pour moi, ont cru en moi sans relâche et ont tout mis en œuvre pour me soutenir.

Je remercie aussi mon petit ami, Martin, avec qui j'ai eu la chance de partager la majorité de mes études et qui a toujours été là pour me soutenir et pour partager les bons moments à l'université.

Finalement, je suis profondément reconnaissante envers mes amis pour tous les instants inoubliables partagés au fil de ces cinq années.

Résumé

Les radeaux lipidiques, microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingolipides, jouent un rôle central dans la régulation de la signalisation cellulaire¹. Dans de nombreux cancers, une augmentation du cholestérol perturbe leur homéostasie, rigidifie et épaissit la membrane plasmique et altère la fonction des récepteurs¹. Le β -sitostérol, stérol végétal, pourrait contrebalancer cet effet en augmentant, entre autres, la fluidité membranaire².

Dans ce travail de fin d'études, un modèle biomimétique de membrane plasmique renfermant des radeaux lipidiques (composé de POPC/SM/Chol) a été utilisé pour évaluer l'impact de la substitution partielle du cholestérol par du β -sitostérol. Les expériences de balance à film en adsorption ont révélé un comportement atypique des courbes pression-temps lors de l'injection de β -sitostérol, suggérant un réarrangement des lipides au sein de la monocouche ou un départ éventuel de lipides dans la sous-phase. Une méthode d'UHPLC MS/MS à triple quadrupôle a été développée pour identifier et quantifier ces lipides.

Les mesures de balance à film en compression ont montré qu'une substitution élevée (50 %) entraîne une expansion de la monocouche, attribuée partiellement à des forces répulsives entre cholestérol et β -sitostérol, tandis qu'une faible substitution (5 %) produit l'effet inverse. Dans les deux cas, la monocouche reste thermodynamiquement stable.

Enfin, des expériences sur liposomes POPC/SM/Chol avec et sans substitution ont permis d'évaluer la fluidité membranaire via la spectroscopie de fluorescence avec la sonde Laurdan. Aucun changement significatif n'a été observé aux faibles substitutions, mais une augmentation nette de la fluidité a été détectée à 50 % de β -sitostérol.

Ces résultats suggèrent que le β -sitostérol peut atténuer l'effet rigidifiant du cholestérol, mais uniquement au-delà d'un seuil critique de concentration.

Transposé aux cellules cancéreuses, ce travail suggère qu'à partir d'une concentration seuil, le β -sitostérol pourrait potentiellement accroître la fluidité membranaire et contrer l'effet rigidifiant du cholestérol. Ceci permettrait d'affaiblir les voies de signalisation pro-survie, tout en facilitant le recrutement des récepteurs apoptotiques et le renforcement de la signalisation pro-apoptotique²⁻⁴.

Abstract

Lipid rafts, membrane microdomains enriched in cholesterol and sphingolipids, play a central role in the regulation of cellular signalling. In many cancers, increased cholesterol disrupts their homeostasis, rigidifies and thickens the plasma membrane, and impairs receptor function¹. β -Sitosterol, a plant sterol, could counteract this effect by, among other things, increasing membrane fluidity².

In this work, a biomimetic plasma membrane model containing lipid rafts (composed of POPC/SM/Chol) was used to evaluate the impact of partially substituting cholesterol with β -sitosterol. Langmuir film balance adsorption experiments revealed atypical pressure–time curves upon β -sitosterol injection, suggesting lipid rearrangement within the monolayer or a possible release of lipids into the subphase. A UHPLC triple quadrupole MS/MS method was developed to identify and quantify these lipids.

Compression isotherms showed that a high substitution level (50%) led to monolayer expansion, partially attributed to repulsive interactions between cholesterol and β -sitosterol, whereas a low substitution level (5%) produced the opposite effect. In both cases, the monolayer remained thermodynamically stable.

Finally, experiments on POPC/SM/Chol liposomes with and without substitution assessed membrane fluidity using Laurdan fluorescence spectroscopy. No significant change was observed at low substitution levels, but a marked increase in fluidity was detected at 50% β -sitosterol. These results suggest that β -sitosterol can mitigate cholesterol-induced membrane rigidification, but only above a critical concentration threshold.

Applied to cancer cells, this work suggests that above a threshold concentration, β -sitosterol could potentially increase membrane fluidity and counteract the rigidifying effect of cholesterol. This would weaken pro-survival signalling pathways while facilitating the recruitment of apoptotic receptors and enhancing pro-apoptotic signalling^{2–4}.

Table des matières

Remerciements	4
Résumé.....	I
Abstract	II
Abréviations	VI
1. Mise en contexte.....	1
2. Etat de l'art	2
2.1 Bases moléculaires de la membrane plasmique : lipides, protéines et signalisation.....	2
2.1.1 Les radeaux lipidiques : illustration de l'hétérogénéité latérale des membranes.....	2
2.1.2 Caveolae : acteurs du transport cellulaire, de la signalisation et de l'endocytose	2
2.1.3 Le cholestérol : un lipide essentiel au sein de la membrane plasmique	3
2.2. Définition générale du cancer	4
2.2.1 Le développement du cancer.....	4
2.2.2 Formation de la tumeur	4
2.2.3 Dissémination des cellules cancéreuses.....	6
2.3. La membrane plasmique des cellules cancéreuses	6
2.3.1 L'importance des radeaux lipidiques et leur relation avec les protéines et récepteurs dans les cellules cancéreuses	7
2.3.2 Les Caveolae dans les cellules cancéreuses	9
2.3.3 Cholestérol et cancer	9
2.4. Les phytostérols : un traitement potentiel contre le cancer.....	10
2.4.1 L'absorption du β -sitostérol	11
2.4.2 L'influence du β -sitostérol sur le cholestérol et autres lipides dans les cellules cancéreuses	11
2.5 Outils pour étudier les membranes.....	12
2.5.1 Le modèle monocouche étudié avec la cuve de Langmuir.....	13
2.5.2 Le modèle liposomes utilisé avec la sonde fluorescente Laurdan.....	14
3. Objectifs.....	15
4. Matériel et méthode.....	16
4.1 Réactifs	16
4.2 Solvants	16
4.3 Informations sur les tests statistiques	16
4.4 Balance à film de Langmuir en compression : Effet du β -sitostérol sur les propriétés interfaciales de monocouches lipidiques.....	16
4.4.1 Matériel	16
4.4.2 Solutions.....	17

4.4.3 Protocole	17
4.4.4 Analyse des données.....	17
4.5 Balance à film de Langmuir en adsorption : Evaluation de l'insertion du β -sitostérol dans les membranes biomimétiques.....	18
4.5.1 Matériel	18
4.5.2 Solutions	18
4.5.3 Protocole.....	18
4.5.4 Analyse de données	18
4.6 Mise au point d'une méthode analytique par UHPLC MS/MS à triple quadrupôle pour la détection et la quantification de lipides	19
4.6.1 Echantillons	19
4.6.2 UHPLC MS/MS à triple quadrupôle.....	19
4.6.3 Colonne utilisée	19
4.6.4 Paramètres	19
4.6.5 Phases mobiles	19
4.6.6 Etapes réalisées et optimisation	19
4.6.7 Concentrations utilisées.....	20
4.6.8 Adaptation du gradient.....	20
4.7 Etude de la fluidité membranaire en fonction de la composition	21
4.7.1 Solutions	21
4.7.2 Formation des films lipidiques	21
4.7.3 Formation des liposomes	21
4.7.4 Réalisation des mesures au Técan	21
4.7.5 Traitement des résultats	21
5. Résultats et discussion	23
5.1 Choix des modèles	23
5.2 Effet du β -sitostérol sur les propriétés interfaciales de monocouches lipidiques	23
5.2.1 Etude de l'aire interfaciale moyenne occupée par les molécules au sein de la monocouche et de la compressibilité de la monocouche.....	23
5.2.2 Analyse thermodynamique des isothermes de compression des mélanges	29
5.2.3 Conclusion	31
5.3 Evaluation de l'insertion du β -sitostérol dans les membranes biomimétiques	32
5.4 Mise au point d'une méthode analytique par UHPLC MS/MS à triple quadrupôle pour la détection et la quantification de lipides	35
5.4.1 Mise en contexte	35
5.4.2 Recherches préalables.....	35
5.4.3 Réalisation des analyses en SCAN-mode : comparaison ESI+ et ESI-.....	36

5.4.4 Réalisation des analyses en SCAN-mode : comparaison des phases mobiles avec et sans formiate d'ammonium	37
5.4.5 Détermination de l'ion fragment à partir de l'ion précurseur	42
5.4.6 Optimisation des paramètres.....	43
5.4.7 Analyse multiple reaction monitoring	47
5.4.8 Analyse des échantillons récoltés dans la sous-phase de la balance à film	50
5.5 Effet du β -sitostérol sur la fluidité membranaire	50
6. Conclusion et perspectives	54
7. Bibliographie.....	56
8. Annexes.....	62
8.1 LEXIQUE.....	75
8.2 Contribution personnelle	76

Table des illustrations

Figure 1. Organisation de la membrane plasmique selon Sezgin et al.,2017 .	2
Figure 2 . Modèles illustrant la formation de tumeurs selon Castaneda et al.2022	5
Figure 3. Dissémination des cellules cancéreuses selon Castaneda et al. 2022.....	6
Figure 4 . structure chimique du : (I) 4-désméthyl-stérol (β -sitostérol (II) 4 α -monométhyl-stérols (obtusifoliol) (III) 4,4-diméthyl-stérols (cycolartanol) selon Ovesná et al.,2004	10
Figure 5. Structure chimique du (1) β -sitostérol (2) stigmastérol (3) campestérol selon Lee et al, 2012	10
Figure 6. structures chimiques a. cholestérol b. β -sitostérol selon Gallovà et al,2010.....	11
Figure 7 diagramme de phase selon Almeida et al. 2003	14
Figure 8. Pression de surface en fonction de l'aire moyenne occupée par une molécule de POPC, de cholestérol, de β -sitostérol et de sphingomyéline à une interface air-tampon (pH7,4 10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl).....	24
Figure 9. Pression de surface en fonction de l'aire moyenne occupée par une molécule de cholestérol de β -sitostérol, du mélange chol/sito 95 :5 et du mélange chol/sito 50 :50	26
Figure 10. boxplots des $C_s - 1$ pour les mélange binaires chol/sito	27
Figure 11. Pression de surface en fonction de l'aire moyenne occupée par une molécule du mélange 1 :1 :1 POPC/SM/chol, du mélange 1 :1 :0,95 :0,05 POPC/SM/chol/sito et du mélange 1 :1 :0,5 ;0,5 POPC/SM/chol/sito.....	28
Figure 12. Injection de β -sitostérol (concentration finale d 0,6 μ M) en sous- phase (10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,4 à 25°C) sous une monocouche POPC/SM/chol 1 :1 :1	32
Figure 13. Pression de surface à l'équilibre après injection de β -sitostérol (concentration finale de 0,6 μ M) en sous-phase (10mM Tris-HCl, 150mM Nacl pH 7,4 à 25°C) en fonction de la pression de surface initiale pour un modèle POPC/SM/ chol 1 :1 :1, 30 :30 :40 et 20 :20 :60	33
Figure 14. Pression de surface à l'équilibre après injection de β -sitostérol (concentration finale de 0,6 μ M) en sous-phase (10mM Tris-HCl, 150mM Nacl pH 7,4 à 25°C) en fonction de la pression de surface initiale pour un modèle DOPC/SM/ chol 1 :1 :1	34
Figure 15. Chromatogrammes de l'ergostérol en mode scan a.. EIC 395,3 ESI ⁻ b. EIC 397,3 ESI ⁺	37
Figure 16. Chromatogramme a. EIC 731,6 sphingomyéline sans formiate d'ammonium b. spectre de masse de la sphingomyéline sans formiate d'ammonium c. EIC 731,6 sphingomyéline avec formiate d'ammonium d. spectre de masse de la sphingomyéline avec formiate d'ammonium	39

Figure 17. Chromatogrammes a. EIC 760,6 POPC sans formiate d'ammonium b. spectre de masse du POPC sans formiate d'ammonium c. EIC 760,6 POPC avec formiate d'ammonium d. spectre de masse du POPC avec formiate d'ammonium	40
Figure 18. chromatogrammes a. EIC 369,4 cholestérol sans formiate d'ammonium b.spectre de masse du cholestérol sans formiate d'ammonium c. EIC 369,4 cholestérol avec formiate d'ammonium d. spectre de masse du cholestérol avec formiate d' ammonium.....	42
Figure 19. Optimisation de la tension capillaire a. Pour l'ergostérol, le β -sitostérol et le cholestérol b. pour le DOPC, POPC, SM et PLPC	45
Figure 20. Optimisation de la pression du nébuliseur a. pour l'ergostérol, le cholestérol et le β -sitostérol b ; pour le DOPC, PLPC et la SM c. pour le POPC	46
Figure 21 Optimisation de la tension de la buse a. Pour le DOPC, POPC , PLPC, SM b. pour l'ergostérol, le β -sitostérol et le cholestérol	46
Figure 22. Analyse MRM a. sphingomyéline b. spectre de masse de la sphingomyéline.....	48
Figure 23 Analyse MRM a. du POPC b. spectre de masse du POPC.....	49
Figure 24. Analyse MRM a.cholestérol b. spectre de masse du cholestérol	50
Figure 25. Polarisation généralisée (GP) du Laurdan selon le pourcentage de substitution du cholestérol par le β -sitostérol pour les modèles 1 :1 :1 et 20 :20 :60 POPC/SM/chol.....	51
Tableau 1. Gradient utilisé lors des analyses a. ESI+/ESI-,avec et sans formiate d'ammonium en, Product ion b. d'optimisation c. MRM	20
Tableau 2. Aire au take-off, aire au collapse, pression de surface au collapse et module de compressibilité des composés seuls	25
Tableau 3. Aire au take -off, aire au collapse, pression au collapse et module de compressibilité pour le cholestérol, le β -sitostérol, le mélange chol/sito 95:5 et le mélange chol/sito 50 :50.....	26
Tableau 4. Aire au take-off, aire au collapse, pression au collapse et module de compressibilité pour le mélange POPC/SM/chol 1 :1 :1, le mélange POPC/SM/chol/sito 1 :1 :0,95 :0,05 et le mélange POPC/SM/chol/sito 1 :1 ;0,5 ;0,5	28
Tableau 5. Excès d'aire à 20mN/m, excès d'énergie libre de Gibbs et énergie libre de Gibbs du mélange entre 0 et 20 mN/m pour les mélanges 95 :5 chol/sito et 50 :50 chol/sito	30
Tableau 6. Excès d'aire à 20 mN/m, excès d'énergie libre de Gibbs et énergie libre de Gibbs du mélange entre à et 20 mN/m pour les mélanges 1 :1 :1 POPC/SM /chol, 1 :1 :0,95 :0,05 POPC/SM/chol/sito et 1:1 :0,5:0,5 POPC/SM/chol/sito.....	30
Tableau 7. Masses moléculaires et masses des potentiels ions pouvant être observés en ESI+ et ESI-	35
Tableau 8. Ions précurseurs et leurs fragments ciblés ainsi que leur temps de rétention	43
Tableau 9. valeurs déterminées par optimisation de la méthode pour l'énergie de collision et la tension du fragmenteur	44
Tableau 10 Temps de rétention des ions fragments lors de l'analyse MRM après modification du gradient	47
Tableau 11 . Médiane, valeur maximale et minimale de GP pour chaque modèle testé	51

Abréviations

Chol :cholestérol

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

EIC : extracted ion chromatogram

ESI : electospray ionisation

GP : polarisation généralisée

HCl : acide chlorhydrique

Laurdan : 6-Dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene

MRM :multiple reaction monitoring

NaCl :chlorure de sodium

PC :phosphatidylcholine

PLPC : 1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

Sito : β -sitostérol

SM :sphingomyéline

Tris : 2-amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol

π : pression

1. Mise en contexte

Chaque année, plus de 17 millions de nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués dans le monde⁵. Cette maladie est responsable d'environ 10 millions de morts par an, ce qui en fait un enjeu majeur non seulement pour la santé publique, mais également sur les plans sociétal et économique^{5,6}.

Bien que les protéines aient longtemps été au cœur de la recherche contre le cancer, l'intérêt pour les lipides au sein de ce domaine devient grandissant⁵.

Ainsi, la reprogrammation du métabolisme lipidique constitue l'une des altérations métaboliques majeures observées dans un grand nombre de cas de cancers entraînant une augmentation de la synthèse, du stockage et de l'absorption des lipides, ce qui favorise la progression tumorale⁷.

Parmi ces lipides, le cholestérol, composant essentiel des radeaux lipidiques impliqués dans les voies de signalisation cellulaire, joue un rôle clé dans la structure et la fonction des membranes cellulaires⁸. Une dérégulation de son homéostasie est susceptible de contribuer à l'apparition et à la progression de certains cancers⁸.

Une augmentation de la proportion de cholestérol a été observée dans divers types de cancers, provoquant une rigidification membranaire susceptible de perturber l'homéostasie cellulaire^{9,10}.

Dans ce travail, une attention particulière sera accordée au β -sitostérol, un phytostérol. Ce composé aurait la capacité, notamment par le biais de l'alimentation, de substituer le cholestérol au sein des membranes plasmiques et des radeaux lipidiques². Il pourrait également augmenter la fluidité membranaire des cellules cancéreuses et, en déstabilisant les radeaux lipidiques, affaiblir les voies de signalisation pro-survie, tout en facilitant le recrutement des récepteurs apoptotiques et le renforcement de la signalisation pro-apoptotique²⁻⁴.

2. Etat de l'art

2.1 Bases moléculaires de la membrane plasmique : lipides, protéines et signalisation

La membrane plasmique des cellules mammaliennes est une bicouche lipidique hautement organisée, constituée principalement de phosphoglycérolipides tels que la phosphatidylcholine, de sphingolipides dont la sphingomyéline, de glycolipides et de cholestérol, au sein de laquelle s'insèrent des protéines transmembranaires assurant les échanges, la communication et la transduction des signaux cellulaires (Figure 1)^{11,12,13}. Elle joue un rôle clé dans la régulation des fonctions cellulaires, notamment dans la transduction des signaux¹.

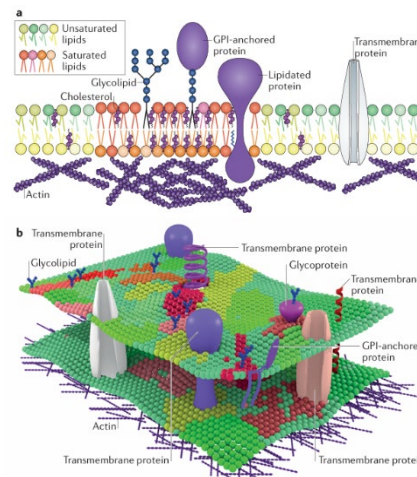


Figure 1. Organisation de la membrane plasmique selon Sezgin et al., 2017.

2.1.1 Les radeaux lipidiques : illustration de l'hétérogénéité latérale des membranes

Au sein des membranes, certains lipides s'organisent de manière hétérogène, donnant naissance à des domaines denses appelés radeaux lipidiques¹. Ces structures, aux propriétés biophysiques distinctes, sont constituées de cholestérol et de lipides saturés, dont l'interaction favorise la formation de domaines membranaires compacts, capables de recruter sélectivement certains lipides et protéines¹⁴. Ainsi, la densité et l'activité des récepteurs de signalisation est compartimentée¹. Bien que la définition des radeaux lipidiques fasse l'objet de débats, Pike (2006) en a proposé une qui les décrit comme des nanodomaines membranaires hétérogènes et dynamiques, caractérisés par une mobilité latérale et un équilibre d'association-dissociation. Ces structures, riches en cholestérol et en sphingolipides, mesurent entre 10 et 200 nm. Lorsqu'elles s'assemblent sous l'effet d'interactions protéine-protéine et protéine-lipide, elles peuvent donner naissance à des domaines microscopiques de plus de 300 nm^{14,15}. Au sein de ceux-ci, on retrouve principalement des phospholipides saturés, des sphingolipides, des glycolipides, du cholestérol, des protéines lipidées et des protéines ancrées à la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'enrichissement de ces domaines en composés hydrophobes leur confère des propriétés spécifiques, notamment une organisation lipidique plus compacte, une structure plus ordonnée et une fluidité réduite¹⁴. Les radeaux lipidiques permettent de concentrer des récepteurs membranaires, des phosphatases, des kinases et des molécules de signalisation permettant ainsi de centraliser les voies de signalisation. Ceux-ci peuvent même adapter leur composition et leur taille et organisation spatiale en réponse aux stimuli et par conséquent changer l'activité des protéines en leur sein¹⁶. Au sein de la membrane plasmique des globules rouges, des radeaux lipidiques ont été identifiés. Ces radeaux sont respectivement enrichis en cholestérol, en ganglioside GM1/PC/chol, et en SM/PC/chol¹⁶.

2.1.2 Caveolae : acteurs du transport cellulaire, de la signalisation et de l'endocytose

Les membranes plasmiques contiennent également des caveolae qui sont de petites invaginations enrichies en cholestérol de dimensions comprises entre 60 et 80 nm régies par les cavéolines et les cavines. Elles sont respectivement présentes au sein de la membrane et dans le cytoplasme. Parmi les

cavéolines, la cavéoline-1 (Cav-1) lie le cholestérol régissant ainsi l'homéostasie de celui-ci. Les caveolae exercent d'autres rôles également, comme la régulation lipidique, les événements de signalisation, l'endocytose, la transcytose, l'adhésion cellulaire, la migration et la protection mécanique. En plus du cholestérol, on retrouve également des sphingomyélines, des glycosphingolipides, de la phosphatidylsérine et du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2)¹⁶.

2.1.3 Le cholestérol : un lipide essentiel au sein de la membrane plasmique

Le cholestérol joue un rôle clé dans la formation des radeaux lipidiques, où il structure les lipides par positionnement près des chaînes hydrocarbonées saturées des phospholipides. Par conséquent, son affinité se voit modifiée en fonction du ou des lipide(s) avec le(s)quel(s) il est en contact. Par ordre décroissant d'affinité le cholestérol interagit avec la sphingomyéline, suivie par la phosphatidylsérine, la phosphatidylcholine, puis la phosphatidyléthanolamine¹⁶.

Il favorise des processus comme la signalisation, les interactions cellulaires et la plasticité membranaire (endocytose, bourgeonnement des vésicules extracellulaires). Il contribue au maintien de l'intégrité de la membrane plasmique, régule ses propriétés biophysiques, et influence la répartition latérale et transversale des lipides. En effet, une asymétrie latérale mais également transversale existe au sein de la membrane plasmique. Le cholestérol agit également comme précurseur des hormones stéroïdiennes, de la vitamine D et des oxystérols, qui participent à la régulation de l'homéostasie du cholestérol et sont impliqués dans divers troubles dégénératifs et cancéreux¹⁶.

La teneur en cholestérol au sein des membranes plasmiques dépend d'un type de cellule à un autre. Par exemple, la membrane plasmique des globules rouges humains et des myoblastes L6 non différenciés contient entre 40 et 50 % de cholestérol, contre 30 à 40 % pour les cellules de Schwann NF1T, les cellules CHO et les plaquettes humaines, et seulement 10 % dans les macrophages alvéolaires humains et les fibroblastes de la lignée NIH 3T3¹⁶.

2.1.3.1 L'homéostasie du cholestérol

La régulation du cholestérol intracellulaire repose en grande partie sur le réticulum endoplasmique, qui agit comme un capteur. Lorsque la concentration de cholestérol dans le réticulum endoplasmique diminue, cela active les protéines Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBP). Ces dernières migrent alors vers le noyau, où elles stimulent la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse et l'absorption du cholestérol par la cellule¹⁶.

La biosynthèse du cholestérol s'effectue via la voie du mévalonate et est finement régulée, notamment par deux enzymes clés et limitantes : la HMG-CoA réductase (HMGCR) et la squalène monooxygénase. L'activation du facteur SREBP2 joue un rôle central dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes cholestérogéniques¹⁶.

Cependant, la synthèse de novo n'est pas le seul moyen pour les cellules d'acquérir du cholestérol. En effet, les cellules peuvent également capter le cholestérol présent dans le milieu extracellulaire via un processus d'endocytose médiée par récepteur, notamment grâce aux récepteurs des LDL (Low-Density Lipoproteins) (LDLR)^{2,16}.

À l'inverse, lorsque le taux intracellulaire de cholestérol devient trop élevé, il active les récepteurs nucléaires LXR (Liver X Receptors), qui induisent l'expression de gènes favorisant son exportation hors de la cellule. Ceux-ci sont activés par des ligands comprenant deux isoformes qui sont LXR-alpha et LXR-bêta². Le cholestérol peut alors être exporté vers le sang par des transporteurs de la famille

ABC, tels que ABCA1 et ABCG1, ou encore être excrété dans la lumière intestinale et les voies biliaires grâce au complexe ABCG5/ABCG8¹⁶.

Par ailleurs, pour éviter l'accumulation toxique de cholestérol libre, celui-ci peut être estérifié dans le réticulum endoplasmique par les enzymes membranaires ACAT (acyl-CoA:cholestérol acyltransférases), puis stocké sous forme d'esters dans des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. La régulation de ces enzymes dépend de différents facteurs : l'interféron- γ , l'acide tout-trans-rétinoïque, la dexaméthasone (un glucocorticoïde synthétique), et le TNF (facteur de nécrose tumorale) pour ACAT1, tandis que ACAT2 est régulé par les facteurs nucléaires des hépatocytes HNF1 α et HNF4 α , ainsi que par la protéine homéobox CDX2¹⁶.

2.2. Définition générale du cancer ¹

La majorité des définitions du cancer s'alignent globalement sur celle de l'institut national du cancer aux Etats-Unis, qui décrit le cancer comme une maladie où certaines cellules du corps se multiplient de façon incontrôlable et se propagent à d'autres régions du corps^{17,18}. En 2023, Brown *et al.* ont défini le cancer comme une maladie de prolifération incontrôlée de cellules transformées, soumises à l'évolution par sélection naturelle. Cette définition inclut les processus tumoraux favorisant la métastase et les changements génétiques et épigénétiques conduisant au phénotype létal¹⁸. Le cancer résulte de plusieurs facteurs, tels que l'exposition à des agents chimiques cancérigènes, les infections virales, les altérations épigénétiques et les mutations somatiques¹⁸.

2.2.1 Le développement du cancer

Selon Lemaire *et al.* 2020, « Le processus de cancérogenèse est traditionnellement considéré comme un processus multi étapes ayant pour origine l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur.¹⁹ » Au cours de ces étapes, les cellules cancéreuses développent diverses propriétés biologiques, telles qu'une prolifération accrue, une capacité à envahir les tissus environnants et à se disséminer dans l'organisme. Elles peuvent également échapper aux mécanismes liés au vieillissement cellulaire et à l'apoptose, ou encore favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins¹⁹. Ces caractéristiques résultent généralement de multiples altérations génétiques de l'ADN nucléaire, comprenant principalement des amplifications, des délétions, des insertions, des mutations ponctuelles, ainsi que des réarrangements chromosomiques ou géniques. On observe également des modifications épigénétiques de la chromatine, entraînant des perturbations dans la transcription de certains gènes¹⁹.

2.2.2 Formation de la tumeur

La formation d'une tumeur cancéreuse se déroule en deux phases distinctes. La première, appelée phase d'initiation, correspond à une altération irréversible de l'ADN, conférant à la cellule initiée des modifications génotypiques essentielles à sa transformation. Bien que cette cellule conserve initialement une apparence normale, elle porte en elle les mutations nécessaires à son évolution maligne. La seconde phase, dite de progression, est plus longue et se caractérise par une prolifération clonale exponentielle de la cellule initiée. Cette phase conduit à l'acquisition définitive du phénotype néoplasique, marqué par une croissance cellulaire accélérée, le développement d'un réseau vasculaire tumoral, une capacité d'invasion des tissus environnants, la formation de métastases ainsi que des modifications biochimiques, métaboliques et morphologiques irréversibles. De cette phase résulte la transformation des lésions précancéreuses en tumeur maligne¹⁹.

¹ Un lexique définissant le vocabulaire relatif au cancer est présent en annexe

Les cellules tumorales possèdent plusieurs caractéristiques en commun qui sont : un potentiel réplicatif illimité, l'échappement au système immunitaire, la capacité potentielle à former des métastases, la capacité d'angiogenèse, l'instabilité génétique, la résistance à l'apoptose, des perturbations métaboliques, une auto-suffisance en facteur de croissance et une insensibilité aux signaux d'arrêt de prolifération¹⁹.

2.2.1 Modèles théoriques de la formation de tumeurs

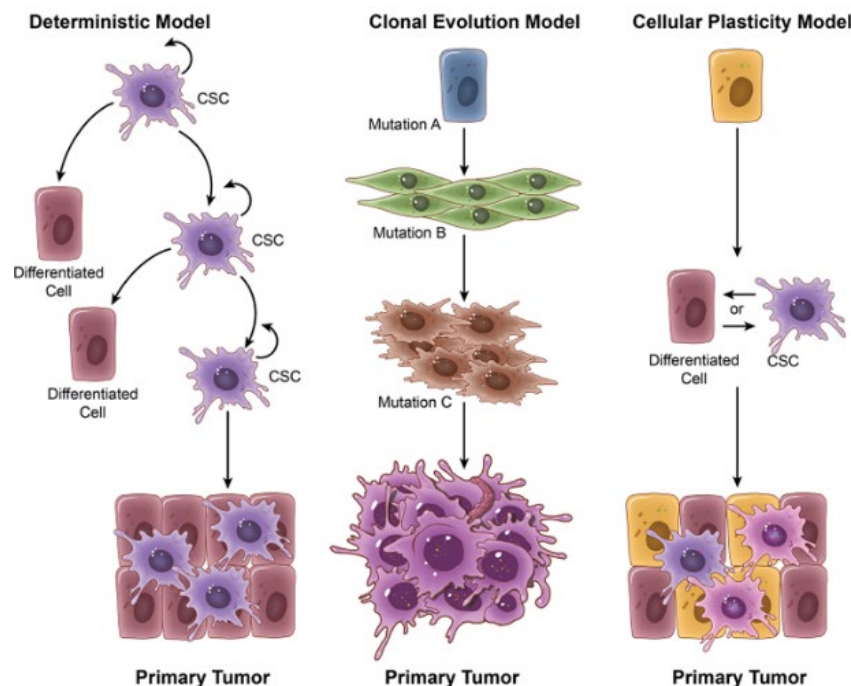


Figure 2 . Modèles illustrant la formation de tumeurs selon Castaneda et al.2022

Trois modèles expliquent la formation des tumeurs.

Le modèle de l'évolution clonale (ou stochastique), basé sur une vision darwinienne de la tumorigenèse, propose que l'accumulation progressive de mutations génétiques ou de modifications épigénétiques entraîne l'émergence de clones de cellules tumorales. Par un processus de sélection naturelle, les clones présentant un avantage prolifératif survivent et se multiplient plus rapidement dans leur microenvironnement. Cette expansion clonale favorise la croissance de la tumeur et sa progression vers un état de plus en plus agressif, conduisant à la formation d'une tumeur primaire (Figure 2)^{19,20}.

À la fin des années 1990, le modèle des cellules souches cancéreuses (CSCs), également appelé modèle hiérarchique ou déterministique, a été proposé. Il suggère que certaines cellules tumorales, appelées cellules souches cancéreuses, possèdent des capacités uniques d'auto-renouvellement et de différenciation, leur permettant d'initier et de maintenir la croissance tumorale. Ces cellules seraient à l'origine des tumeurs primaires et joueraient un rôle clé dans la formation des métastases, notamment en favorisant la résistance aux traitements et la dissémination tumorale (Figure 2)^{19,20}.

Un modèle récent tenant compte de l'hétérogénéité tumorale a été proposé : le modèle hybride de plasticité cellulaire. Contrairement aux modèles précédents, celui-ci suggère que certaines cellules néoplasiques non tumorigènes, grâce à leur plasticité innée, peuvent se redifférencier en cellules souches cancéreuses (CSC). De plus, sous l'influence de stimuli internes ou externes au cours de la

progression tumorale, ces CSC pourraient acquérir de nouvelles mutations et altérations génétiques, entraînant l'émergence de sous-populations dotées d'un avantage prolifératif (Figure 2)^{19,20}.

2.2.3 Dissémination des cellules cancéreuses

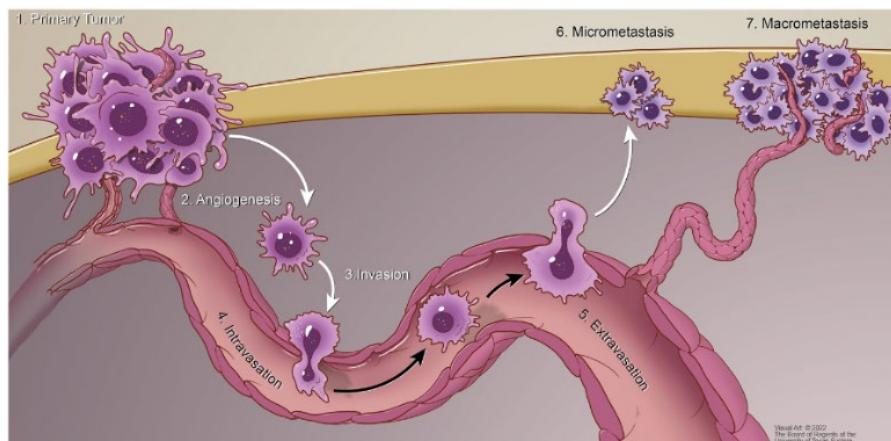


Figure 3. Dissémination des cellules cancéreuses selon Castaneda et al. 2022

Les cellules cancéreuses peuvent se propager dans le corps par le biais de l'angiogenèse, qui est un mécanisme clé de leur dissémination. L'angiogenèse se caractérise par la formation de vaisseaux sanguins autour de la tumeur qui sont mal structurés, hyperplasiques, avec un excès de ramifications et une perméabilité élevée, permettant ainsi aux cellules tumorales de s'échapper du site primaire²⁰.

Ainsi, l'angiogenèse favorise la formation d'un réseau vasculaire capable d'apporter l'oxygène et les nutriments essentiels aux cellules cancéreuses, tout en créant un micro-environnement spécifique où les cellules endothéliales de la paroi vasculaire et les cellules tumorales interagissent¹⁹. En outre, les cellules cancéreuses peuvent se disséminer via la circulation sanguine, les voies lymphatiques et périneurales. Ces cellules peuvent également envahir les tissus voisins (invasion) ou pénétrer dans la circulation sanguine (intravasation), pour ensuite sortir de celle-ci par extravasation et se propager dans des tissus distants. Après l'extravasation, elles peuvent soit former des micro-métastases qui restent en dormance, soit se développer en macro-métastases (Figure 3)²⁰.

2.3. La membrane plasmique des cellules cancéreuses

Pour résister à la réponse immunitaire et à la chimiothérapie, les cellules cancéreuses ont la capacité de s'adapter. Parmi ces adaptations, on trouve l'altération du métabolisme lipidique des cellules néoplasiques, ce qui modifie la composition de la membrane cellulaire et par conséquent ses propriétés²¹. Les altérations du métabolisme lipidique peuvent influencer la composition et les propriétés de la membrane plasmique. Ainsi, la composition lipidique des cellules cancéreuses diffère de celle des cellules non malignes et varie selon les types de cancers. Cependant, aucun profil lipidique spécifique ne permet de les distinguer avec certitude, d'autant plus que leur composition évolue en fonction de leur état physiologique²¹. En effet, il est très difficile de définir le pourcentage de cholestérol présent au sein d'une membrane plasmique de cellule cancéreuse puisque celui-ci dépend non seulement du type ou sous-type de cellule mais également de la progression du cancer. Par exemple, le taux de cholestérol peut diminuer lors de l'étape de l'angiogenèse permettant ainsi une meilleure plasticité de la membrane pour réaliser l'intra et l'extravasation¹⁶. Même s'il n'est pas évident de trouver le taux de cholestérol présent au sein des membranes plasmiques de cellules

cancéreuses, on considère que celui-ci augmente, avec la malignité, d'environ 50 % que ce soit au sein du feuillet externe de la membrane plasmique ou au sein des domaines sous-micrométriques¹⁶. Cependant, certaines études suggèrent un taux encore plus élevé au sein des radeaux lipidiques¹⁶. Cette augmentation du cholestérol au sein des membranes plasmiques s'explique en partie par l'augmentation de l'expression de LDLR².

2.3.1 L'importance des radeaux lipidiques et leur relation avec les protéines et récepteurs dans les cellules cancéreuses

Les cascades de signalisation au sein des radeaux lipidiques jouent un rôle clé dans la survie, la mort et la métastase des cellules cancéreuses¹. Ainsi, les radeaux lipidiques pourraient constituer une cible pour les traitements anticancéreux¹.

Les radeaux lipidiques assurent le support structural des récepteurs qu'ils hébergent. Ainsi, leur enrichissement en récepteurs de survie peut favoriser la progression tumorale et le développement d'une résistance aux traitements. À l'inverse, le ciblage et l'intégration de récepteurs de mort dans ces microdomaines pourraient représenter une stratégie prometteuse pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses¹. Ces structures jouent donc un rôle ambivalent, pouvant à la fois soutenir la prolifération, la survie et l'invasion des cellules tumorales, tout en offrant un levier potentiel pour leur élimination, influençant ainsi de manière décisive l'évolution du cancer¹⁶.

Les radeaux lipidiques contiennent des récepteurs spécifiques, tels que le récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1 (IGF-1R) et le récepteur de l'insuline (IR), capable d'activer des voies de signalisation favorisant la croissance cellulaire et inhibant l'apoptose. Ces récepteurs interagissent avec les facteurs de croissance de type insulinique (IGFs), notamment IGF-1 et IGF-2, qui jouent un rôle clé dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules tumorales. Ainsi, la déplétion en cholestérol des radeaux lipidiques empêche l'ancrage d'IGF-1R, réduisant l'efficacité des voies de survie qu'il active et rendant les cellules tumorales plus sensibles à l'apoptose¹.

Au sein des radeaux lipidiques, l'enzyme hétérodimérique phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est également présente et peut être activée par le système IGF. Une fois activée, elle phosphoryle le lipide Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), permettant ainsi le recrutement et l'activation de la protéine kinase B (Akt). Cette activation favorise la prolifération cellulaire, stimule le métabolisme et inhibe l'apoptose. Dans de nombreux cancers, PTEN, une phosphatase qui agit comme un frein sur la voie PI3K/Akt en dégradant PIP3, est inactivée ou absente, entraînant une activation excessive et persistante de cette voie^{1,16}. Des études ont montré que le cholestérol membranaire joue un rôle essentiel dans l'activation de la voie PI3K/Akt, dont la perturbation par inhibition de sa synthèse ou extraction de la membrane compromet l'activation d'Akt et favorise l'apoptose¹⁶.

H-Ras est une protéine de la famille des GTPases Ras, localisée dans les radeaux lipidiques, dont l'activation dépend de la teneur en cholestérol membranaire. Cette famille est impliquée dans la régulation de processus cellulaires clés tels que la croissance, la prolifération, la différenciation et la motilité¹⁶.

Le Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase impliqué dans la régulation de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaires. Il est fréquemment surexprimé dans de nombreux cancers. Son activation déclenche des voies de signalisation majeures telles que les voies des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), Akt et les kinases N-terminales¹⁶.

Les MAPK régulent des processus cellulaires clés tels que l'expression des gènes, la mitose, le métabolisme, la motilité, la survie, l'apoptose et la différenciation, en phosphorylant principalement des résidus de sérine et de thréonine sur diverses protéines cibles²². Quant aux c-Jun N-terminal (JNK), protéines kinases faisant partie de la superfamille des MAP kinases, elles sont impliquées à la fois dans les voies de prolifération cellulaire et d'apoptose. Leur activation dépend des stimuli rencontrés et se fait par phosphorylation multiple dans les voies intrinsèques et extrinsèques²³. Localisé dans les radeaux lipidiques, l'EGFR est fortement dépendant du cholestérol membranaire pour sa signalisation. La déplétion en cholestérol peut perturber son activité, et plusieurs études montrent que la réduction du cholestérol améliore l'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinase comme le gefitinib¹⁶.

À contrario, au sein des cellules, on retrouve des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFRSF), appelés récepteurs à la mort cellulaire, qui activent les voies de l'apoptose en se liant à leurs ligands homologues. On retrouve quatre types : le récepteur au facteur neurotrophique p75 (p75^{NTR}), le récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale (TNFR1), le récepteur Fas (CD95), et les récepteurs du ligand inducteur d'apoptose apparenté au TNF (FRAIL)¹⁶.

Le récepteur transmembranaire Fas/CD95, doté d'un domaine de mort (death domain, DD), joue un rôle central dans la régulation de l'apoptose via la liaison à son ligand Fas ligand (FasL). Ce récepteur a une tendance accrue à s'agréger au sein des radeaux lipidiques, ce qui peut favoriser son activation. Lorsqu'il est ancré dans ces microdomaines membranaires et qu'il interagit avec FasL, la protéine adaptatrice contenant un domaine de mort associée au récepteur Fas (FADD) est recrutée. FADD permet alors le rapprochement des procaspases-8 et -10, menant à la formation du complexe de signalisation inducteur de mort (complexe DISC). Au sein de ce complexe, les procaspases subissent un clivage protéolytique pour devenir des caspases initiateurs actives, qui déclenchent à leur tour une cascade d'activation des caspases effectrices, conduisant à l'apoptose. Exploiter ce mécanisme en favorisant l'accumulation des récepteurs de mort dans les radeaux lipidiques pourrait ainsi constituer une stratégie prometteuse pour induire l'autodestruction ciblée des cellules tumorales^{1,16}.

Un mécanisme similaire est observé pour le ligand inducteur d'apoptose apparenté au TNF (TRAIL), après sa fixation sur ses récepteurs DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2), avec la formation du complexe DISC et l'activation de la voie apoptotique¹⁶.

Les radeaux lipidiques contiennent également des récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 1 (VEGFR1) qui inhibe l'angiogenèse et VEGFR2 qui l'augmente¹.

Le Cluster de différenciation 44 (CD44) est un récepteur clé de l'adhérence cellulaire impliqué dans la migration et l'invasion des cellules tumorales, jouant ainsi un rôle central dans la progression métastatique. Bien qu'il puisse être localisé dans les radeaux lipidiques, sa délocalisation vers des régions non-raft de la membrane facilite son clivage par des métalloprotéases telles que la Protéine de désintégrine et métalloprotéase 10 (ADAM10). Ce processus favorise la migration cellulaire. Par conséquent, stabiliser CD44 dans les radeaux lipidiques pourrait représenter une stratégie pertinente pour limiter la dissémination des cellules cancéreuses¹³.

Le cholestérol joue un rôle clé dans la modulation de l'immunité innée et adaptative, notamment en structurant les radeaux lipidiques, qui servent de plateformes pour le recrutement de récepteurs immunitaires tels que les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs de haute affinité pour l'immunoglobuline E (FcεRI), ainsi que les récepteurs des cellules B et T. Toutefois, il reste encore incertain, selon la littérature actuelle, qu'une déplétion en cholestérol dans un contexte tumoral perturbe la signalisation de ces cellules immunitaires¹⁶.

Le cholestérol participerait également à la formation de microvésicules qui sont des vésicules de diamètre compris entre 100 nm et 1µm limitées par une bicouche lipidiques et générées par la formation locale et le bourgeonnement de la membrane plasmique¹⁶.

Récemment d'autres protéines interagissant avec les lipides et le cholestérol ont été découvertes ou étudiées comme le récepteur du peptide-1 glucagon-like (GLP1-R) dont l'action dépend, entre autres, de la teneur en cholestérol de l'environnement ou la protéine de transfert de lipides de type pont 1 (BLTP)^{24,25}.

2.3.2 Les Caveolae dans les cellules cancéreuses

Les caveolae pourraient être impliquées dans le développement du cancer, notamment via la caveoline-1 (Cav-1), dont le rôle semble ambivalent, pouvant agir à la fois comme un oncogène ou comme un suppresseur tumoral. Par ailleurs, l'expression des cavines 1, 2 et 3 (Cavin-1, -2, -3) est fréquemment réduite, voire absente, dans plusieurs types de cancers¹⁶.

Les cellules cancéreuses produisent des invadopodes, des prolongements membranaires riches en actine, capables de dégrader la matrice extracellulaire afin de faciliter leur migration dans l'environnement. La biogenèse de ces structures, ainsi que leur activité protéolytique, dépend du cholestérol et de la cavéoline-1 (Cav-1), qui joue un rôle clé dans le transport du cholestérol vers la membrane plasmique. Les radeaux lipidiques sont dirigés vers les sites d'invadopodes pour permettre la formation de ces protrusions membranaires. Par conséquent, la déplétion en cholestérol inhibe la formation des invadopodes¹⁶.

2.3.3 Cholestérol et cancer

Au cours de l'évolution de la cellule cancéreuse, le taux de cholestérol peut varier. En effet, lors de la préparation à la phase de métastase, la teneur en cholestérol membranaire diminue afin d'augmenter la fluidité et la plasticité de la membrane pour pénétrer dans les vaisseaux sanguins²⁶. Les cellules cancéreuses possèdent généralement une teneur élevée en cholestérol ce qui engendre une épaisseur et une rigidité accrues de la membrane et par conséquent une résistance à certains médicaments lors des traitements contre le cancer¹⁶. De plus, une teneur élevée en cholestérol permet de pouvoir reformer des membranes lors des divisions et multiplications cellulaires élevées¹⁶. Ainsi, bien que le cholestérol joue un rôle essentiel dans la fluidité membranaire, dans la régulation de l'activité des protéines membranaires, dans la coordination de diverses voies de signalisation ainsi que dans les réponses immunitaires, son homéostasie peut être perturbée en contexte cancéreux. Cette dérégulation le rend alors favorable à la croissance et à la métastase des cellules tumorales. Il apparaît donc pertinent d'explorer des stratégies thérapeutiques ciblant le métabolisme du cholestérol².

2.4. Les phytostérols : un traitement potentiel contre le cancer

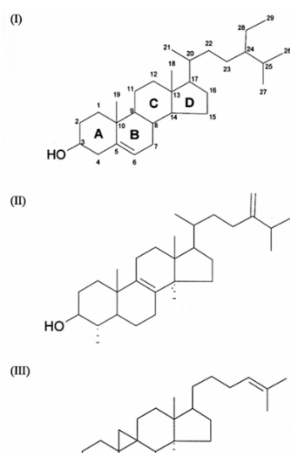


Figure 4 . structure chimique du : (I) 4-désméthyl-stérol (β -sitostérol) (II) 4 α -monométhyl-stérols (*obtusifolol*) (III) 4,4-diméthyl-stérols (*cycolartanol*) selon [Ovesná et al., 2004](#)

Les phytostérols, un sous-groupe des stéroïdes, ont été identifiés dans une grande diversité de plantes et d'organismes marins où ils sont présents sous forme libre ou estérifiée^{17,27}. Ils sont classés en trois groupes : les 4-désméthylstérols, les plus répandus, ainsi que les 4 α -monométhyl-stérols et les 4,4-diméthyl-stérols, qui sont moins courants (Figure 4)^{27,28}. Parmi les 4-désméthyl-stérols, on retrouve principalement le β -sitostérol, le campestérol et le stigmastérol (Figure 5)^{27,29}.

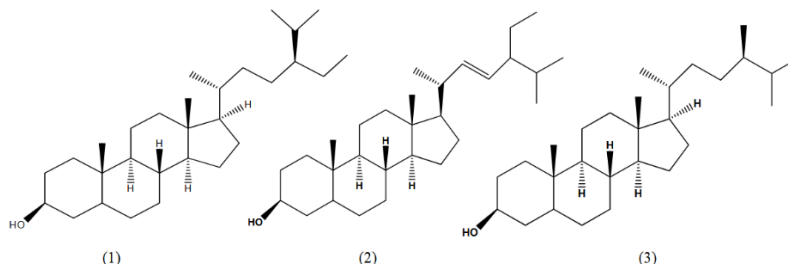


Figure 5. Structure chimique du (1) β -sitostérol (2) stigmastérol (3) campestérol selon [Lee et al, 2012](#)

La consommation de phytostérols limite l'absorption intestinale du cholestérol, ce qui entraîne une baisse du taux de cholestérol LDL dans le sang et, par conséquent, une réduction du risque de maladies cardiovasculaires¹⁷. De plus, les phytostérols semblent posséder des propriétés anticancérigènes pour certains types de cancers (poumons, estomac, ovaires, sein œstrogène-dépendant) via plusieurs mécanismes¹⁷. En effet, ils réduiraient la production de radicaux libres en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes, limitant ainsi les dommages à l'ADN. Ils inhiberaient la croissance des cellules cancéreuses et favoriseraient leur apoptose en activant la caspase-3 et en diminuant l'expression de Bcl-2. De plus, ils freineraient l'angiogenèse et la formation de métastases en réduisant l'adhérence et la migration des cellules cancéreuses. Toutefois, certaines études suggéreraient que leur effet sur l'angiogenèse pourrait varier selon le contexte, nécessitant des recherches supplémentaires pour mieux comprendre leur rôle précis dans ce processus¹⁷.

Finalement, en s'intégrant aux membranes cellulaires, ils modifieraient les radeaux lipidiques, perturbant les signaux favorisant la survie des cellules tumorales. En abaissant le cholestérol sanguin, ils limiteraient son accumulation dans les membranes cancéreuses, favorisant ainsi leur destruction¹⁷. Les phospholipides interagissent plus fortement avec le cholestérol qu'avec les phytostérols. Ainsi, l'incorporation des phytostérols dans la membrane plasmique pourrait en altérer la structure, en particulier celle des radeaux lipidiques, où les stérols sont hautement concentrés et impliqués dans la régulation des cascades de phosphorylation. Par conséquent, l'intégration des phytostérols pourrait influencer la transduction des signaux cellulaires¹⁷. De plus, la diminution du cholestérol sanguin pourrait favoriser l'apoptose car ce lipide, en s'intégrant aux membranes plasmiques, joue un rôle positif dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. En particulier, dans les cellules de la prostate, une diminution du cholestérol entraîne une augmentation de l'activité de la caspase-3 et une réduction de la transduction des signaux Akt et ERK, connus pour leurs effets anti-apoptotiques. Ainsi, en réduisant l'absorption et le taux sanguin de cholestérol, les phytostérols pourraient limiter son incorporation dans les radeaux lipidiques des cellules cancéreuses, favorisant ainsi l'apoptose et inhibant les voies de signalisation anti-apoptotiques¹⁷.

Lors de ce travail, les recherches seront axées sur le β -sitostérol qui est le phytostérol le plus abondant au sein des plantes. Celui-ci a montré de nombreux effets contre le cancer comme celui du foie, du col

de l'utérus, du côlon, de l'estomac, du sein, du poumon, du pancréas et de la prostate, en plus de la leucémie, du myélome multiple, du mélanome et du fibrosarcome. Le β -sitostérol semble être une molécule qui pourrait avoir un avenir prometteur dans la prévention et le traitement des cancers².

2.4.1 L'absorption du β -sitostérol

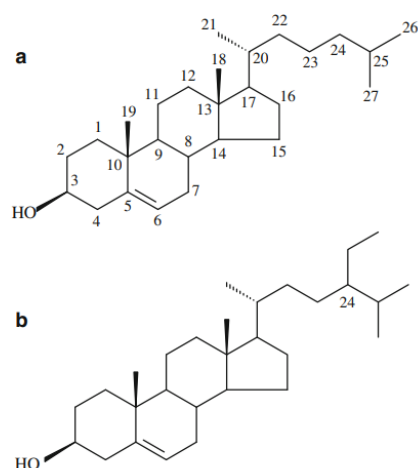


Figure 6. structures chimiques a. cholestérol b. β -sitostérol selon Gallovà *et al*, 2010

Le cholestérol et les phytostérols possèdent des structures assez similaires. En effet, la seule différence est la présence d'un groupement supplémentaire sur le carbone C24 pour les phytostérols par rapport au cholestérol. Pour le β -sitostérol, il s'agit d'un groupement éthyl (Figure 6)^{2,30}.

Bien que les phytostérols ne peuvent être synthétisés au sein du corps humain, ceux-ci peuvent être absorbés mais toutefois, en proportion plus faible que le cholestérol. En effet, on considère que seulement 5 à 10% du β -sitostérol consommé est absorbé par l'intestin contre 45 à 54% du cholestérol consommé². En moyenne l'Homme consomme entre 40 et 400 mg de phytostérols par jour². Après ingestion, les phytostérols sont émulsifiés dans l'intestin grêle par les sels biliaires, puis hydrolysés en phytostérols libres pour leur absorption. Ils sont ensuite captés par les entérocytes via des transporteurs ABC, où ils sont transformés en chylomicrons et libérés dans la circulation sanguine. Après passage dans le système lymphatique, ils atteignent le foie, où ils peuvent être utilisés pour la synthèse des

sels biliaires, intégrés aux lipoprotéines pour distribution, ou directement incorporés dans la membrane plasmique des cellules¹⁷. Ceux-ci se retrouvent principalement concentrés au sein des poumons, du cortex surrénalien, de l'épithélium intestinal et des ovaires¹⁷.

2.4.2 L'influence du β -sitostérol sur le cholestérol et autres lipides dans les cellules cancéreuses

Le β -sitostérol a la capacité d'agir soit au niveau de la synthèse du cholestérol en la réduisant soit au niveau de l'incorporation au sein des membranes où il entre en compétition avec le cholestérol².

Cependant, la perturbation de la synthèse du cholestérol ne se produit pas au même stade selon le type de cancer. Ainsi, pour le cancer du sein, la cible du β -sitostérol se situe en amont de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A reductase (HGMCR), une enzyme membranaire du réticulum endoplasmique lisse qui catalyse la conversion de la HMG-CoA en mévalonate, tandis que pour le cancer du côlon, la cible est directement cette enzyme³¹.

Dans la lumière de l'intestin grêle, le β -sitostérol peut entrer en compétition avec le cholestérol en raison de la forte similarité de leurs structures, ce qui conduit à une diminution de l'absorption du cholestérol. La présence d'un groupement éthyl supplémentaire sur le β -sitostérol augmente son hydrophobicité, lui permettant ainsi de concurrencer efficacement le cholestérol pour son incorporation dans les micelles. De plus, les entérocytes expriment des transporteurs de type Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), impliqués dans l'absorption intestinale du cholestérol, dont l'activité peut être inhibée par le β -sitostérol².

Selon Awad *et al.* (1996), un traitement de neuf jours au β -sitostérol à une concentration de 16 μ M a entraîné une réduction de 26 % du cholestérol membranaire dans les cellules cancéreuses du côlon

HT-29. Ce traitement a également affecté d'autres lipides membranaires, notamment la sphingomyéline, dont la teneur a diminué de 50 %³².

Cette diminution de la sphingomyéline pourrait être liée à l'augmentation de la céramide observée lors du traitement des cellules LNCaP (modèle de cancer de la prostate) par le β -sitostérol. En effet, ce traitement entraîne non seulement une réduction de la croissance cellulaire et une augmentation de l'apoptose, mais également une hausse de 50 % de la production de céramide. Cette élévation pourrait résulter de l'activation du cycle de la sphingomyéline par le β -sitostérol, la céramide étant un intermédiaire clé de cette voie métabolique³³. De plus, la production de céramide pourrait être un point clé puisque qu'il s'avère que la céramide est un suppresseur de tumeur, favorisant des signaux qui induisent l'apoptose, des réponses autophagiques et l'arrêt du cycle cellulaire³⁴. De plus, les céramides sont capables de s'assembler pour former des microdomaines et de rentrer en compétition avec le cholestérol au cours de l'insertion au sein de la membrane plasmique³⁵.

Toutefois, ces propos sont à nuancer. Certains articles généralisent en parlant de « la »céramide. Or, il en existe une multitude pouvant différer par leur saturation, leur longueur de chaîne ou encore leur hydroxylation. Il a ainsi été montré que certaines comme le C-16 céramide, peuvent favoriser la prolifération tumorale, tandis que d'autres, comme le C18-céramide, sont plutôt apoptotiques³⁶.

Awad *et al.* (2007) ont démontré qu'un enrichissement en β -sitostérol inhibe la croissance des cellules d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7 (modèle de cancer du sein à un stade précoce) et MDA-MB-231 (modèle de stade avancé), après un traitement de 3 à 5 jours avec des concentrations comprises entre 8 et 16 μ M. Cette inhibition pourrait s'expliquer par une incorporation significative du β -sitostérol dans les membranes cellulaires, accompagnée d'une augmentation notable de l'expression des récepteurs Fas et de l'activité de la caspase-8³⁷. L'augmentation de la concentration du récepteur Fas pourrait être expliquée par le fait que le β -sitostérol perturbe la rigidité membranaire induite par le cholestérol en la diminuant, en raison de son groupement éthyle supplémentaire, ce qui affecte la transduction du signal via les récepteurs Fas².

De plus, le β -sitostérol aurait un effet anticancéreux en inhibant l'expression du LDLR et est capable d'activer LXR-alpha et LXR- β ².

Une autre protéine pourrait encore être impliquée, la protéine à domaine synaptotagmine étendue 2 (E-syt 2) présente au sein du réticulum endoplasmique qui transporte les lipides vers la membrane plasmique. Le β -sitostérol lui, présente une forte affinité pour son isomère, E-syt 1. Il est possible que par ce mécanisme, le β -sitostérol interfère avec le transfert du cholestérol jusqu'à la membrane plasmique².

De plus, les cellules saines ne semblent pas être affectées de manière négative lors du traitement au β -sitostérol. En effet, il a été constaté que le β -sitostérol n'avait pas sur les cellules saines intestinales (CaCo2) d'effet pro-apoptotique³⁸.

2.5 Outils pour étudier les membranes

Afin d'étudier l'interaction entre le β -sitostérol et la membrane plasmique, divers outils et modèles de membrane peuvent être utilisés³⁹.

Parmi les différents modèles existants, on retrouve les monocouches lipidiques, les bicouches lipidiques et les liposomes.

Dans ce travail, seul le modèle de monocouche lipidique et celui des liposomes seront utilisés.

La monocouche lipidique, bien que moins adaptée à l'étude des processus transmembranaires, permet de mieux comprendre les phénomènes se produisant à la surface des membranes. Elle offre également la possibilité de faire varier aisément la densité et la composition en lipides à l'interface⁴⁰.

Les liposomes sont des vésicules sphériques formées par une (unilamellaire) ou plusieurs (multilamellaire) bicouches lipidiques entourant un compartiment aqueux^{39,41,42}. Ceux-ci reproduisent plus fidèlement la structure des membranes cellulaires. Ils se déclinent en plusieurs tailles : petites vésicules unilamellaires (SUV, de 10 à 100nm), grandes vésicules unilamellaires (LUV, 100 à 1000 nm) ou géantes vésicules unilamellaires (GUV, supérieur à 1µm)^{39,43}. Lors de ce travail, des modèles POPC/SM/chol ont été choisis afin de mimer des membranes présentant des radeaux lipidiques.

2.5.1 Le modèle monocouche étudié avec la cuve de Langmuir

La technique de la cuve de Langmuir permet d'étudier, à l'échelle micrométrique (lorsqu'elle est couplée à un microscope de Brewster), les interactions lipide-lipide, protéine-lipide ou médicament-lipide en utilisant une monocouche formée à l'interface air-eau³⁹.

Lors de ce travail, deux modes de mesure ont été appliqués : la compression isotherme et l'adsorption³⁹.

Le mode adsorption consiste à déposer une monocouche lipidique jusqu'à une pression de surface cible, puis à injecter les molécules tensioactives dans la sous-phase et mesurer l'évolution de la pression de surface au cours du temps³⁹. L'évolution de la pression de surface au cours du temps permet d'évaluer la capacité des molécules tensioactives à s'adsorber à l'interface air-eau ou à s'insérer dans la monocouche lipidique. L'analyse de la variation maximale de la pression de surface, une fois l'équilibre atteint, en fonction de la pression initialement appliquée à la monocouche permet d'identifier des paramètres caractéristiques de la molécule tensioactive. Le premier est la pression d'exclusion (Π_e) qui est un indicateur de la capacité d'insertion des molécules au sein de la monocouche lipidique³⁹. Le deuxième est le facteur d'attractivité permet de mesurer l'intensité d'interaction entre la molécule incorporée et la monocouche lipidique⁴⁴.

Les expériences de compression isotherme réalisées avec une cuve de Langmuir consistent à étaler une monocouche lipidique à l'interface air-eau, puis à diminuer progressivement la surface disponible par compression. Cette réduction entraîne une modification de la pression de surface. Ce protocole permet d'obtenir diverses informations, notamment sur la surface occupée par molécule, les différentes phases de la monocouche, sa stabilité, sa compressibilité en deux dimensions, ainsi que les interactions entre la monocouche et les composés présents dans la sous-phase³⁹.

Lors de la réalisation d'expériences avec la cuve de Langmuir, il est primordial de prêter attention aux transitions de phases⁴⁵. En effet, en fonction de la température, les lipides s'organisent en différentes phases et formes d'assemblage. Les phospholipides saturés, présentant de longues chaînes d'acyle qui leur permettent une plus grande compaction, ont tendance à former une phase liquide

ordonnée (haut point de fusion), tandis que les phospholipides insaturés ont tendance à former une phase liquide

désordonnée (bas point de fusion)⁴⁶.

Toutefois, en fonction de la température, ces lipides peuvent s'organiser autrement, donnant alors des phases liquides plus ou moins ordonnées, voire même des phases solides. Ainsi, un mélange ternaire de lipides permet de construire un diagramme de phase triangulaire (Figure 7). Dans le contexte des radeaux lipidiques, le stérol (souvent le cholestérol) se trouve au sommet, le lipide le plus saturé dans le coin inférieur droit et le moins saturé dans le coin inférieur gauche, ce qui mène à des zones de coexistence entre liquide ordonné, liquide désordonné et solide ordonné. Ce dernier est à éviter lors des

expériences en cuve de Langmuir puisqu'il rend le film moins stable et homogène empêchant ainsi la reproductibilité mais également la représentativité biologique⁴⁷.

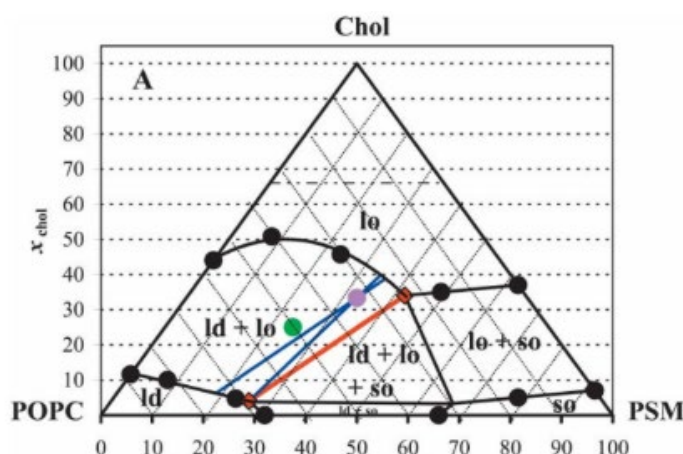


Figure 7 diagramme de phase selon Almeida et al. 2003

2.5.2 Le modèle liposomes utilisé avec la sonde fluorescente Laurdan

La sonde fluorescente 6-dodecanoyl-2-di-méthylamino naphthalène (Laurdan) est une sonde fluorescente amphiphile largement utilisée pour étudier l'organisation et la dynamique des membranes lipidiques. Le Laurdan s'insère dans la bicouche lipidique en interagissant avec les chaînes acyles, tandis que son groupe chromophore se localise à proximité du glycérol, à l'interface hydrophile/hydrophobe. Cette position stratégique rend le Laurdan sensible aux variations locales d'hydratation et de fluidité, qu'il détecte via des changements dans son spectre d'émission de fluorescence. Ces variations sont dues à la relaxation dipolaire, un phénomène résultant de la réorientation des molécules de solvant autour de la sonde excitée^{48,49}.

Le spectre d'émission du Laurdan varie de 440 nm (milieu faiblement polaire, peu hydraté correspondant à une phase gel) à 490 nm (milieu plus polaire et hydraté correspondant à une phase liquide désordonnée). Le paramètre de polarisation généralisée (GP), calculé à partir de ces deux longueurs d'onde, permet de quantifier l'état de la membrane. Une valeur GP élevée correspond à une membrane rigide et peu hydratée (phase $L\beta'$), tandis qu'une valeur GP faible indique une membrane fluide et plus hydratée (phase $L\alpha$)^{48,49}.

3.Objectifs

Ce travail vise à étudier l'influence du β -sitostérol sur des membranes biomimétiques de cellules cancéreuses afin de mieux comprendre son impact sur l'organisation des lipides dans les membranes cellulaires. Il contribuera ainsi à se rendre compte comment le β -sitostérol pourrait exercer un effet anticancéreux en modulant spécifiquement les lipides, en particulier le cholestérol. Cette connaissance du mécanisme moléculaire pourrait, à terme, aider à améliorer l'efficacité des traitements.

Plusieurs études se sont intéressées à l'influence du β -sitostérol sur les propriétés mécaniques des membranes cellulaires telles que la rigidité, la fluidité et l'élasticité, en particulier dans le contexte de radeaux lipidiques^{3,50}. La plupart de ces travaux comparent son effet à celui du cholestérol. Toutefois, la majorité de ces travaux portent sur des modèles binaires, le plus souvent composés uniquement de stérol et de phosphatidylcholine⁵¹⁻⁵⁵. Les modèles ternaires contenant un sphingolipide sont plus rarement étudiés, bien que ceux-ci soient plus représentatifs des membranes cellulaires complexes.

Alors que certaines études ont utilisé la balance à film en mode compression pour évaluer l'influence du β -sitostérol sur les propriétés d'une monocouche lipidique, des travaux en mode adsorption sur ce sujet ne semblent pas être rapportés dans la littérature⁵¹. Pourtant, ce type d'approche pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes et cinétique d'interaction entre le β -sitostérol et des modèles biomimétiques de membranes présentant des radeaux lipidiques, en l'occurrence ici le mélange POPC/SM/chol, mettant ainsi en évidence la cinétique d'adsorption du β -sitostérol par la monocouche ainsi que la tendance des molécules à s'accumuler à l'interface.

Par ailleurs, en ce qui concerne l'hydratation et la fluidité membranaire, certaines études ont été menées sur des modèles stérol/phosphatidylcholine en utilisant la sonde fluorescente Laurdan ou une autre sonde^{54,55}. Toutefois, là encore, aucune de ces recherches n'intègre de sphingolipides. On trouve également des travaux réalisés avec la sonde Laurdan sur des modèles ternaires de type DOPC/SM/chol, mais sans référence au β -sitostérol⁴⁹.

Ce travail de fin d'études vise à combler ces manques en établissant des liens entre différentes approches expérimentales et en mettant en parallèle l'influence du β -sitostérol sur des modèles biomimétiques de membranes cellulaires et ses implications potentielles dans les traitements contre les cancers, à travers une revue de la littérature.

4. Matériel et méthode

4.1 Réactifs

Lors des expériences menées, divers lipides ont été utilisés :

- La sphingomyéline (99+%, CAS : 383907-91-3, ref : 860062P, Lot : A-140, Avanti Polar Lipids)
- Le β -sitostérol (99+%, CAS : 5779-62-4, ref : 700107P, Lot : C-010, Avanti Polar lipids)
- Le cholestérol (99+%, CAS : 57-88-5, ref : C8667-1G, Lot : 050K5304, Sigma)
- Le POPC (99+%, CAS : 26853-31-6, Ref : 850457P, Lot : A-217, Avanti Polar lipids)
- Le DOPC (99+%, CAS : 4235-95-4, ref : 850375P, Lot : Q-341, Avanti Polar lipids)
- Le PLPC (CAS : 159701-21-0, Ref : 850458C, lot : T-065, Avanti polar lipids)
- L'ergostérol (CAS : 57-87-4, Ref : 117810050, Lot : A0436500, Thermo scientific)

Pour la réalisation de phases mobiles :

- L'acide formique (99+%, CAS : 64-18-6, ref : 84865.180, Lot : XL754471, VWR[®])
- Le formiate d'ammonium (99+%, 540-69-2 ref : 84884.180, Lot SU653438, VWR[®])

4.2 Solvants

Pour la réalisation des expériences et la mise en solution des lipides, divers solvants ont été utilisés :

- Le chloroforme (CAS : 67-66-3, Biosolve)
- Le méthanol (CAS : [67-56-1]), Scharlau)
- L'acétate d'éthyle (CAS : 141-78-6, Sigma-Aldrich)
- L'éthanol (CAS : 64-17-5, VWR[®])
- L'eau (CAS : 7732-18-5, VWR[®])
- L'acétonitrile (CAS : 75-05-8, VWR[®])
- L'isopropanol (CAS : 67-63-0, Supelco[®])

Du tampon Tris-HCl 10 mM NaCl 150 mM pH 7,4 a été réalisé avec de l'eau MilliQ, du tris (CAS-No : 77-86-1, Sigma-Aldrich) et du NaCl (Cas-No : 7647-14-5, Supelco[®]).

4.3 Informations sur les tests statistiques

Les seuils de significativité sont fixés sur les valeurs suivantes de p-value ou p-adj :

- p-adj/value > 0,05 : pas de différence significative
- 0,01 < p-adj/value < 0,05 : différence significative
- 0,001 < p-adj/value < 0,01 : différence hautement significative
- p-adj < 0,001 : différence très hautement significative

4.4 Balance à film de Langmuir en compression : Effet du β -sitostérol sur les propriétés interfaciales de monocouches lipidiques

4.4.1 Matériel

La balance à film utilisée est la KSV1002-KSV Mini system 2, Langmuir-Blodgett Balance, KSV instruments LTD

4.4.2 Solutions

Des solutions à 1mM de sphingomyéline, cholestérol, β -sitostérol et POPC ont été préparées dans un mélange chloroforme:méthanol 2:1. De plus, des mélanges ont été préparés également dans un mélange chloroforme :méthanol 2:1.

Il s'agit des mélanges :

- 95:5 chol/sito
- 50:50 chol/sito
- 1:1:1 POPC/SM/chol
- 1:1:0,95:0,05 POPC/SM/chol/sito
- 1:1:0,5:0,5 POPC/SM/chol/sito

4.4.3 Protocole

La cuve utilisée possède une largeur de 75 mm et une aire de 24225 mm². Celle-ci est remplie avec un volume de 250 ml de tampon. Après dépôt d'un volume respectivement de 30 μ L pour la sphingomyéline, le POPC, les mélanges ternaire et quaternaires et 40 μ L pour le cholestérol, le β -sitostérol ainsi que pour les mélanges chol/sito, le film est comprimé à 20°C à une vitesse de 10 mm/s . Les graphes de la pression de surface en mN/m en fonction de l'aire occupée par une molécule en Å² sont ensuite tracés par le logiciel KSV minitrough à raison d'une mesure toutes les 5 secondes.

4.4.4 Analyse des données

Pour tous les modèles, l'aire au take-off (A_0) est définie comme l'aire correspondant à une augmentation de 1,5 mN/m par rapport à la pression de surface initiale. Quant à l'aire au collapse (A_0), celle-ci est définie graphiquement en traçant les tangentes. La pression au collapse (π_c) correspond à la pression en ce point.

La suite des analyses ont été réalisées à 20 mN/m afin d'apparenter les propriétés de la monocouche à celle d'une bicouche tout en se situant avant le point de collapse pour tous les mélanges⁵⁶.

Ensuite, un calcul pour connaître l'aire moyenne théorique par molécule d'un mélange est réalisé grâce à l'équation suivante

$$A_{th} = A_{chol}X_{chol} + A_{sito}X_{sito} + A_{SM}X_{SM} + A_{POPC}X_{POPC} \quad (1)$$

où A représente l'aire moyenne par molécule définie graphiquement pour un composé ou un mélange et X la fraction molaire

Après cela, le calcul d'excès d'aire (A^{exc}) est réalisé comme suit :

$$A^{exc} = A - A_{th} \quad (2)$$

Puis, l'excès d'énergie libre de Gibbs des mélanges est calculé (ΔG_{exc}) :

$$\Delta G_{exc} = \int_0^{\pi} A^{exc} d\pi \quad (3)$$

L'énergie idéale de Gibbs du mélange et l'énergie libre de Gibbs du mélange sont calculées comme suit :

$$\Delta G_{id} = (RT(X_{chol} \ln X_{chol} + X_{sito} \ln X_{sito} + X_{SM} \ln X_{SM} + X_{POPC} \ln X_{POPC}))/6,022 \quad (4)$$

Avec R la constante des gaz parfaits et T la température absolue

$$\Delta G_{\text{mix}} = \Delta G_{\text{exc}} + \Delta G_{\text{id}} \quad (5)$$

Finalement, le module de compressibilité est calculé (C_S^{-1}) :

$$C_S^{-1} = -A \frac{d\pi}{dA} \quad (6)$$

Les comparaisons statistiques sont réalisées à l'aide d'ANOVA. L'homogénéité des variances est vérifiée au moyen du test de Levene. La normalité des résidus a été supposée en raison de la faible taille des échantillons ($n < 10$).

4.5 Balance à film de Langmuir en adsorption : Evaluation de l'insertion du β -sitostérol dans les membranes biomimétiques

4.5.1 Matériel

La balance à film utilisée est la même que celle utilisée pour l'expérience en compression.

4.5.2 Solutions

Différentes solutions à 0,5 mM ont été préparées dans un mélange chloroforme/méthanol 2 : 1 . Respectivement :

- 1:1:1 POPC/SM /chol
- 30:30:40 POPC/SM/chol
- 20:20:60 POPC/SM/chol
- 1:1:1 DOPC/SM /chol

Une solution de β -sitostérol à 2,4 mM a également été préparée dans l'acétate d'éthyle.

4.5.3 Protocole

80 millilitres de tampon sont déposés au sein de la cuve de Langmuir. Le mélange ternaire de lipides est ensuite déposé à la surface jusqu'à atteindre la pression de surface souhaitée (5,10,15,20 ou 25 mN/m). Après stabilisation, 20 μ L de solution de β -sitostérol sont injectés dans la sous-phase. Les courbes de la pression de surface en fonction du temps sont ensuite enregistrées via la logiciel KSV minitrough jusqu'à ce qu'une stabilisation de la pression de surface soit observée. Ces expériences sont réalisées à 25°C afin d'avoir des phases avec des liquides ordonnés et désordonnés et d'éviter la phase gel⁴⁷. Cette température a été définie grâce au diagramme de phase DOPC/SM/chol et POPC/SM/chol^{45,47}.

4.5.4 Analyse de données

La pression de surface à l'équilibre après injection a été recherchée graphiquement.

Les données de la pression de surface à l'équilibre en fonction de la pression initiale par modèle ont été importées dans R et le traitement codé comme facteur.

Un ANCOVA a été ajusté pour étudier l'effet de la pression initiale et du traitement sur la pression de surface à l'équilibre, avec puis sans interaction.

Les comparaisons multiples entre traitements ont été réalisées par test de Tukey post-hoc .

4.6 Mise au point d'une méthode analytique par UHPLC MS/MS à triple quadrupôle pour la détection et la quantification de lipides

4.6.1 Echantillons

Dans un premier temps, une mise au point de méthode a dû être réalisée dans le but d'identifier et de doser les lipides potentiellement récoltés lors de l'expérience de la balance à film en adsorption qui sont le POPC, DOPC, cholestérol, β -sitostérol ainsi que la sphingomyéline. Deux lipides ont également été utilisés dans l'élaboration de la méthode afin de servir de standards internes. Ces lipides sont respectivement l'ergostérol et le PLPC. Les échantillons ont dans un premier temps été préparés séparément à une concentration de 1000 ppm dans du méthanol. Cette concentration variant au cours des expériences (voir concentrations utilisées).

4.6.2 UHPLC MS/MS à triple quadrupôle

La partie UHPLC est composée d'un injecteur automatique 1290 infinity II Bio Multisampler, d'un 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat et d'une 1290 Infinity II High speed pump. Ce qui permet au système de monter jusqu'à 1300 bars.

Le MS couplé à la LC est un 6475 Triple quadrupôle LC/MS doté d'un Jet Stream Technology Ion Source (AJS) en sortie d'UHPLC.

4.6.3 Colonne utilisée

La colonne utilisée est une colonne UPLC Acquity BEH C18 (130 Å, 1,7 μ m x 50 mm x 2,1mm, 1/pk).

4.6.4 Paramètres

Le débit de gaz est fixé à 8 l/min et le débit du gaz de gaine à 11 l/min. Les températures du débit de gaz et du gaz de gaine sont respectivement de 325°C et 350°C. Quant à la température de la colonne, celle-ci est de 65°C.

Avant optimisation, la pression du nébuliseur était fixée à 35 psi, la tension du capillaire à 3000 V et la tension de la buse à 1000V.

4.6.5 Phases mobiles

Les phases mobiles choisies ainsi que le gradient sont ceux utilisés par (Cajka et Oliver Fiehn, 2016)⁵⁷. Dans un premier temps, les phases mobiles utilisées étaient les phases mobiles suivantes (A) 60:40 (v/v) acétonitrile:eau et (B) 90:10 (v/v) isopropanol:acétonitrile avec pour les deux phases mobiles un ajout de 0,5% d'acide formique⁵⁷⁻⁶³. Le débit était de 0,6 mL/min.

4.6.6 Etapes réalisées et optimisation

Ces phases mobiles ont tout d'abord été utilisées pour un essai en mode scan en ESI (-) puis en ESI (+). Ensuite, une seconde expérience en mode scan et ESI(+) a été réalisée avec les mêmes phases mobiles mais contenant un ajout de 10 mM de formiate d'ammonium qui ont été gardées pour la suite des expériences⁵⁷. Un product ion a ensuite été réalisé au préalable d'une optimisation avant de finalement faire un test en mode MRM. Les différents termes des étapes effectuées sont définis dans la section matériel et méthode.

4.6.7 Concentrations utilisées

Pour l'analyse ESI(+)/ESI(-) les deux standards à 1000 ppm ont été testés avec une injection de 10 µL.

L'analyse des phases mobiles avec et sans formiate d'ammonium a été effectuée sur les composés individuels à 1000 ppm pour une injection de 10 µL.

Ensuite, le product ion a été réalisé à partir d'un mélange contenant 200 µL de chaque stérol à 1000 ppm et 100 µL des autres composés à 1000 ppm.

L'optimisation a été faite en trois temps : l'ergostérol et le β -sitostérol à 1000 ppm, le cholestérol seul à 1000 ppm et un mélange SM, POPC, DOPC, PLPC à 500 ppm. L'optimisation a à chaque fois été réalisée avec une injection de 15 µL.

Finalement l'analyse MRM s'est faite à partir d'un mélange constitué des stérols à 1000 ppm et des phosphatidylcholines et de la sphingomyéline à 500 ppm avec une injection de 5 µL.

4.6.8 Adaptation du gradient

Etant donné que tous les composés testés possédaient un temps de rétention inférieur à 5 minutes, le gradient a été adapté (Tableau 1).

Tableau 1. Gradient utilisé lors des analyses a. ESI+/ESI-, avec et sans formiate d'ammonium en, Product ion b. d'optimisation c. MRM

a. Temps (min)	A (%)	B (%)
0,00	85	15
2,00	70	30
2,50	52	48
11,00	18	82
11,50	1	99
12,00	1	99
12,10	85	15
15,00	85	15

b. Temps (min)	A (%)	B (%)
0,00	70	30
6,00	25	75
6,50	1	99
8,50	1	99
8,60	70	30
10,60	70	30

c. Temps (min)	A (%)	B (%)
0,00	70	30
1,00	70	30
7,00	25	75
7,50	1	99
9,50	1	99
9,60	70	30
11,60	70	30

4.7 Etude de la fluidité membranaire en fonction de la composition

4.7.1 Solutions

Une solution de Laurdan (CAS 74515-25-6, ref : 103133023, Lot : #BCCB5249) entre 1 et 3 mM est préparée dans de l'éthanol puis incubée durant 3 heures à 50°C.

Des solutions de 1 mM qui sont respectivement : 1:1:1 POPC/SM/chol et 20:20:60 POPC/SM/chol ainsi que leur homologues avec une substitution de 5 et 50% de substitution du cholestérol par du β -sitostérol pour chacun des modèles sont préparées dans un mélange chloroforme:méthanol 2:1 pour un volume total de 1 mL au sein d'un ballon.

4.7.2 Formation des films lipidiques

Afin de former un film lipidique uniforme, le ballon est placé au rotavapor (R-3000, BUCHI) jusqu'à évaporation complète avec une rotation de 50% à 2°C. Le ballon est ensuite recouvert d'aluminium et placé au sein d'un dessiccateur durant la nuit.

4.7.3 Formation des liposomes

Le film lipidique ainsi obtenu est réhydraté avec 1 mL de tampon avant d'être vortexé et plongé une demi-heure au sein d'un bain-marie à 60°C (cette température se situant au-delà de la température de transition des lipides⁶⁴⁻⁶⁸). Durant cette demi-heure, les ballons sont vortexés toutes les 5 minutes. Après transvasement dans un cryotube, le contenu du ballon subit cinq cycles de congélation (azote liquide) et décongélation (bain-marie à 60°C degrés).

Les liposomes sont ensuite extrudés à travers des membranes de porosité 100 nm (Nucleopore Track-Etch Membrane filtration products, ref : 800309) et un préfiltre (PE drain disc, Ref : 230300, Cytavia WhatmanTM) grâce au système d'extrusion avec support et bloc chauffant (ref : 610000-1Ea, Avanti polar lipids). L'extrusion est effectuée en 50 passages.

Les liposomes ainsi préparés sont ensuite dilués 10 fois. Pour chaque condition, 500 μ L sont incubés une heure en présence de 1 μ L d'éthanol ou de Laurdan.

4.7.4 Réalisation des mesures au Técan

Après incubation, 100 μ L de solution de liposomes sont disposés dans les puits (4 répétitions) et une cinétique de fluorescence d'un quart d'heure est réalisée à l'aide du lecteur Técan (Spark[®]) avec un gain fixé pour que les valeurs de fluorescence soient en dessous de 40 000. Ce gain est maintenu pour un même lot de liposomes. Lors de l'expérience, une mesure de fluorescence est réalisée toutes les 150,01 secondes pendant 900,07 soit 7 mesures à 440 nm et à 480 nm par puit après une agitation de 5 secondes. Ce qui fait 7 mesures par puits, 4 puits par expérience pour 3 expériences indépendantes soit 82 données pour chaque condition.

4.7.5 Traitement des résultats

Après soustraction du blanc aux données, le paramètre de polarisation généralisée est calculé grâce au rapport suivant pour chaque point de la cinétique :

$$GP = \frac{\text{fluorescence à } 440\text{nm} - \text{fluorescence à } 480\text{ nm}}{\text{fluorescence } 440\text{ nm} + \text{fluorescence à } 480\text{ nm}} \quad (7)$$

Ensuite, à partir de ces données, des boxplots sont réalisés grâce au logiciel R.

Les tests statistiques réalisés sont les suivants :

- Un test de Krustal-Wallis afin de déterminer s'il existe des différences significatives entre les groupes d'un même modèle de composition, en fonction du taux de remplacement du cholestérol par le β -sitostérol.
- En cas de différence significative, un test de post-hoc de Wilcoxon (avec correction de Bonferroni) a été appliqué afin d'identifier quelles paires de groupes (avec différents pourcentages de β -sitostérol) présentent une différence significative entre elles.
- Un test Wilcoxon-Mann-Whitney afin de comparer les deux modèles de composition ayant le même pourcentage substitution de β -sitostérol afin d'évaluer si la composition globale influence la polarisation (GP), indépendamment du taux de substitution. Un test de Krustal-Wallis n'est ici pas nécessaire au préalable puisque seuls deux groupes sont comparés.

5. Résultats et discussion

5.1 Choix des modèles

Etant donné que les membranes plasmiques possèdent des proportions de cholestérol très variables en fonction du type de cellule mais également de la localisation au sein de celles-ci (les radeaux lipidiques sont par exemple des régions de la membrane plasmique enrichies en cholestérol), il a été décidé de partir sur un modèle POPC/SM/chol 1:1:1 pour mimer au mieux les radeaux lipidiques de la membrane plasmique d'une cellule non cancéreuse¹⁶.

Etant donné qu'une cellule maligne peut présenter une augmentation de 50% en cholestérol au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique ainsi qu'au sein des domaines submicrométriques, il a, dans un premier temps, été décidé de partir sur un modèle POPC/SM/chol en proportion molaire 30:30:40 afin de mimer les radeaux lipidiques de la membrane plasmique d'une cellule cancéreuse¹⁶. Toutefois, en l'absence de différence significative entre les deux modèles lors de la réalisation des expériences de balance à film en mode adsorption, il a été décidé de poursuivre avec un modèle possédant un taux de cholestérol plus élevé soit un mélange POPC/SM/chol en proportion molaire 20:20:60.

Finalement, la substitution du cholestérol par du β -sitostérol a été fixée à 50% puisqu'une étude a montré que l'enrichissement d'une cellule du cancer du sein en β -sitostérol a causé une diminution de 50% du taux de cholestérol². Une concentration de substitution plus faible a également été choisie et fixée à 5%.

5.2 Effet du β -sitostérol sur les propriétés interfaciales de monocouches lipidiques

Afin d'étudier l'effet du remplacement du cholestérol par du β -sitostérol sur l'organisation moléculaire de films lipidiques, des analyses d'isotherme de compression de monocouches (pression de surface vs aire moléculaire) à une interface air-eau ont été menées.

5.2.1 Étude de l'aire interfaciale moyenne occupée par les molécules au sein de la monocouche et de la compressibilité de la monocouche

Ces analyses ont été réalisées sur différents modèles: les composés purs (le cholestérol, le β -sitostérol, le POPC et la sphingomyéline), des mélanges binaires (95:5 chol/sito et 50:50 chol/sito) et un mélange ternaire (1:1:1 POPC/SM/chol qui correspond au modèle sans substitution du cholestérol par du β -sitostérol) ainsi que deux quaternaires (1:1:0,95:0,05 POPC/SM/chol/sito et 1:1:0,5:0,5 POPC/SM/chol/sito qui correspondent à deux modèles où le cholestérol est partiellement substitué par du β -sitostérol).

La Figure 8 présente les isothermes de compression Π -A des composés purs. La forme et la pente de l'isotherme Π -A du cholestérol et du β -sitostérol purs montrent que les molécules forment exclusivement une monocouche très condensée à l'interface air-eau. Aucune transition de l'état liquide expansé à l'état liquide condensé n'est observée. Les isothermes de la sphingomyéline et du POPC présentent une forme sigmoïdale. Aux grandes surfaces moléculaires, une pression superficielle faible

et relativement constante est enregistrée, correspondant à un état gazeux. Une compression supplémentaire des monocouches de sphingomyéline et POPC induit une augmentation progressive de la pression superficielle, indiquant l'apparition d'un état liquide expansé, caractérisé par un certain degré d'interaction coopérative entre les molécules à l'interface. Cette augmentation de la pression superficielle est suivie d'un plateau final de pression superficielle constante, puis d'une chute de la pression de surface dans le cas de la sphingomyéline uniquement. Aucune augmentation brutale de la pression superficielle n'est observée, même à de très faibles surfaces par molécule, ce qui indique que les monocouches de sphingomyéline et POPC ne peuvent pas adopter un état liquide condensé, même sous forte compression. Le plateau final à pression de surface constante résulte très probablement d'une désorption progressive du lipide de l'interface air-tampon. Dans le cas de la sphingomyéline, la chute de pression de surface correspond à la cassure nette de la monocouche

Les isothermes pression de surface vs aire moléculaire ont permis de déterminer l'aire moléculaire occupée par les molécules à l'interface dans son état le plus expansé (aire au take-off A_0) et dans son état le plus condensé (A_c), la pression de surface à la rupture de la monocouche (P_c) et le module de compressibilité (C_s^{-1}) de la monocouche pour caractériser la stabilité de la monocouche ainsi que l'excès d'aire (A^{exc}), et les paramètres thermodynamiques comme l'excès d'énergie libre (ΔG_{exc}) et des lipides (voir Analyse thermodynamique des isothermes de compression des mélanges) .

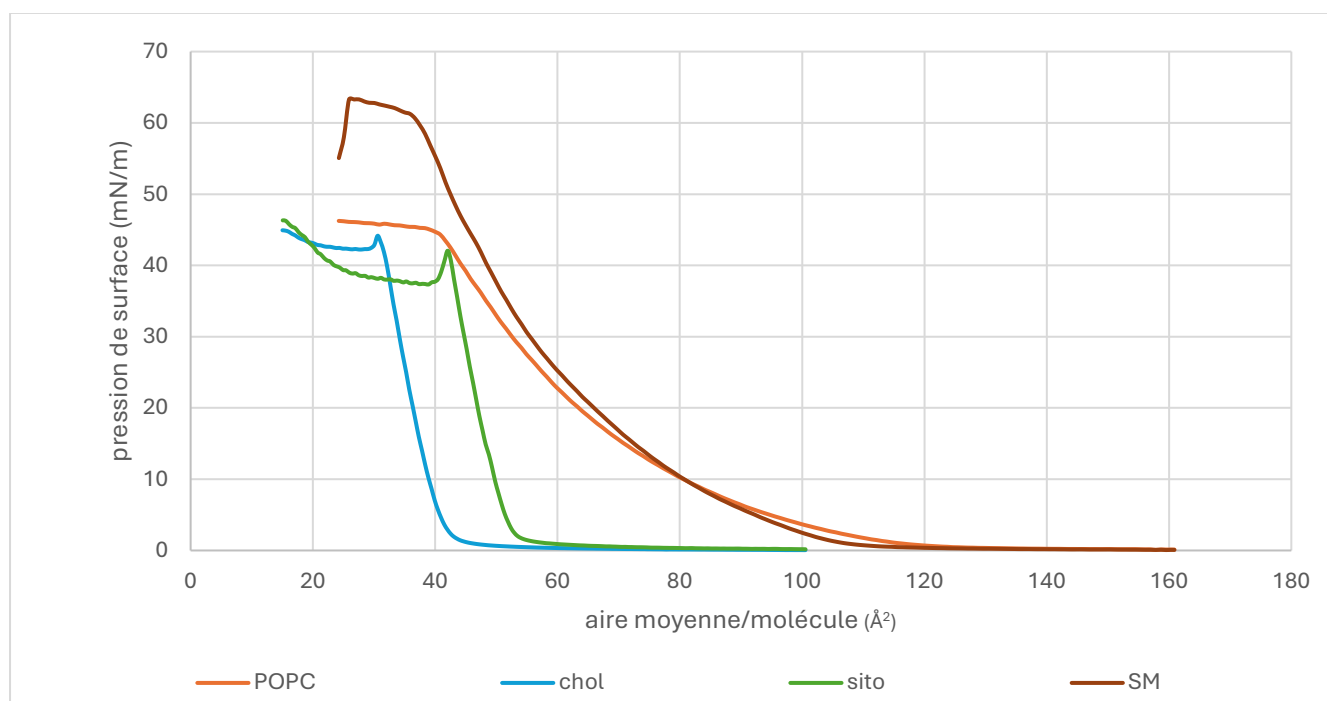


Figure 8. Pression de surface en fonction de l'aire moyenne occupée par une molécule de POPC, de cholestérol, de β -sitostérol et de sphingomyéline à une interface air-tampon (pH7,4 10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)

Tableau 2. Aire au take-off, aire au collapse, pression de surface au collapse et module de compressibilité des composés seuls

	A_0 (\AA^2)	A_c (\AA^2)	Π_c (mN/m)	C_s^{-1} (mN/m)
Chol	43,6±0,2	30,8±0,3	44,0±0,4	167,4±6,8
Sito	54,2±0,8	41,7±0,6	42,0±0,3	212,3±9,4
POPC	111,2 ±1,7	40,4±1,2	44,4±0,6	49,7±3,3
SM	104,3±3,1	36,0±1,3	60,2±2,3	55,1±1,8

Le POPC et la sphingomyéline possèdent des valeurs d' A_0 plus élevées que celles des stérols. Ceci suggère un empilement moléculaire plus serré pour les stérols. (Figure 8, Tableau 2). Il existe une différence hautement significative entre l' A_c du POPC et celle de la sphingomyéline, alors qu'aucune différence significative n'est observée entre l' A_c du β -sitostérol et celle du POPC. Les différences d' A_c entre le cholestérol et le POPC ou la sphingomyéline sont également hautement significatives, ce qui reflète que la sphingomyéline possède au empilement plus compact que le POPC au collapse.

Le β -sitostérol possède des valeurs de A_0 et de A_c plus importantes que le cholestérol suggérant une organisation moins compacte. Cette organisation moins compacte résulte du groupement éthyle supplémentaire en C24 porté par le β - sitostérol entraînant un encombrement stérique et une perturbation de la cohésion moléculaire (Tableau 2) ^{2,3}.

À l'inverse, l'empilement plus compact du cholestérol lui permet de s'insérer facilement au sein des radeaux lipidiques, contribuant ainsi à leur stabilisation et rigidification.

Les isothermes de compression du POPC et de la sphingomyéline présentent des valeurs de C_s^{-1} très hautement significativement plus faibles que celle des stérols. C_s^{-1} exprime la stabilité mécanique et l'élasticité de la monocouche. Des valeurs élevées relatent une monocouche plus rigide et des interactions plus fortes alors que des valeurs plus faibles illustrent un système plus fluide et désordonné⁶⁹. Le POPC et la sphingomyéline forment donc des monocouches plus fluides et établissent des interactions moléculaires moins fortes que celle des stérols (Tableau 2). Le C_s^{-1} plus élevé du β -sitostérol par rapport au cholestérol indique que la monocouche qu'il forme est plus élastique, moins compressible et donc plus rigide (Tableau 2) .

Il n'existe pas de différence significative entre les Π_c des deux stérols et le POPC ce qui signifie qu'il n'existe pas de différence de résistance à l'effondrement entre ces trois monocouches. Par contre, la sphingomyéline est capable de résister plus efficacement à la compression que POPC et les deux stérols. La sphingomyéline résiste mieux à la compression que le POPC et les stérols, en raison de son squelette sphingosine rigide, de ses chaînes acyl longues, et de ses interactions intermoléculaires renforçant la cohésion du film (Tableau 2).

La Figure 9 et le tableau 3 présentent les isothermes de compression et les paramètres caractéristiques correspondants pour les mélanges binaires Chol/sito 95:5 et Chol/sito 50:50.

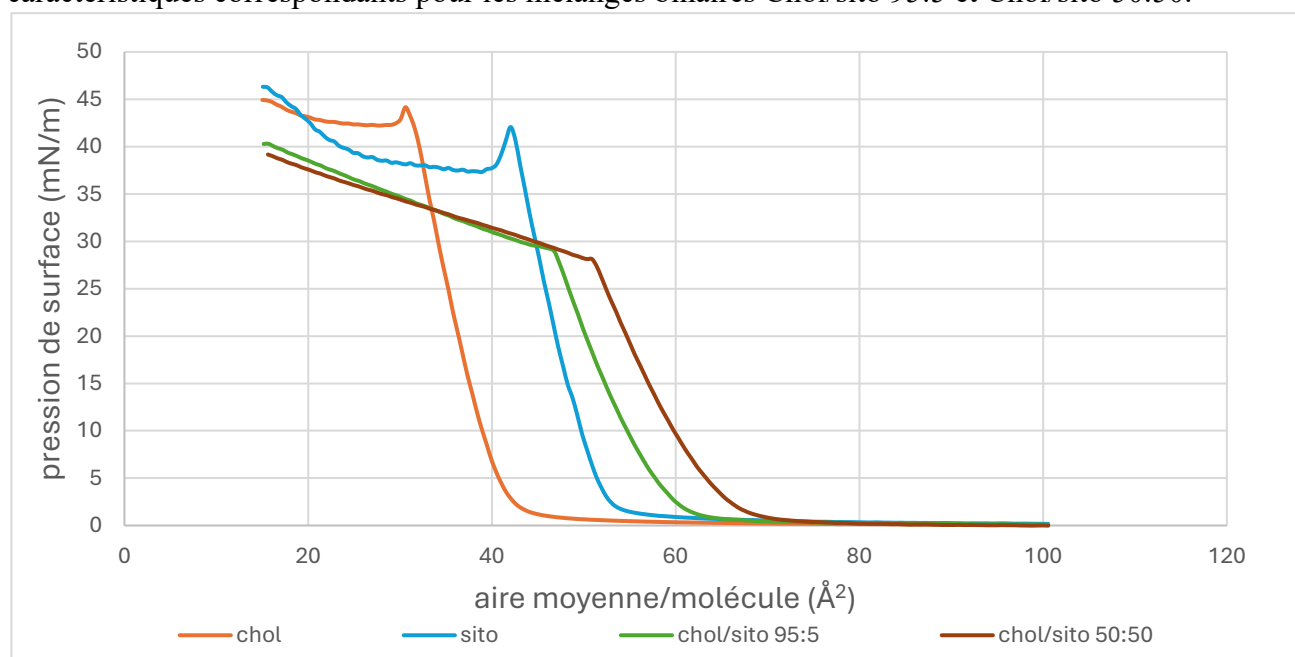


Figure 9. Pression de surface en fonction de l'aire moyenne occupée par une molécule de cholestérol de β -sitostérol, du mélange chol/sito 95 :5 et du mélange chol/sito 50 :50

Tableau 3. Aire au take -off, aire au collapse, pression au collapse et module de compressibilité pour le cholestérol, le β -sitostérol, le mélange chol/sito 95:5 et le mélange chol/sito 50 :50

	A_0 (Å ²)	A_c (Å ²)	Π_c (mN/m)	C_s^{-1} (mN/m)
Chol	43,6±0,2	30,8±0,3	44,0±0,4	167,4±6,8
Sito	54,2±0,8	41,7±0,6	42,0±0,3	212,3±9,4
95 :5 chol/sito	61,4±0,4	46,3±0,1	29,1±0,2	127,0±1,9
50 :50 chol/sito	67,2 ±0,7	50,4±0,7	27,9±0,2	121,0±4,4

Le mélange chol/sito 50:50 présente des valeurs de A_c et A_0 plus grandes que le mélange 95:5, lequel affiche lui-même des valeurs de A_c et A_0 supérieure au cholestérol ou au β -sitostérol purs.

Cela signifie que les mélanges binaires présentent une organisation moléculaire moins compacte que les composés seuls. Par ailleurs, cette compaction diminue avec l'augmentation de la proportion de β -sitostérol. Elle est plus importante dans le mélange contenant 5% de β -sitostérol que dans celui à 50%(Tableau 3, Figure 9).

Les Π_c ne sont pas significativement différents entre les modèles binaires mais bien très hautement significativement plus faibles de celles des composés purs. La rupture de la monocouche à une pression plus faible pour les mélanges chol/sito par rapport aux composés seuls résulte en une monocouche moins stable à la compression (Tableau 3).

Les C_s^{-1} des mélanges binaires sont moins élevées (différence hautement significative) que ceux des composés purs composants le mélange mais il n'existe pas de différence significative entre les C_s^{-1} des mélanges binaires (Tableau 3). Cela traduit que l'élasticité des mélanges binaires est nettement plus faible, ce qui reflète une compressibilité plus importante et une rigidité moindre de la monocouche. Cette diminution de rigidité s'accompagne d'une moindre résistance des monocouche binaires à la compression, confirmée par les valeurs plus faibles de Π_c . Enfin, le taux de β -sitostérol

dans le mélange n'a pas d'impact significatif sur la rigidité ni sur la stabilité des monocouches lipidiques (Tableau 3). De plus, alors que l'on s'attendrait à ce que le C_s^{-1} des mélanges se situent à une valeurs intermédiaire des C_s^{-1} des stérols purs ceux-ci sont significativement plus bas que les deux stérols montrant ainsi que l'élasticité des mélange n'a pas un comportement de mélange idéal (Figure 10).

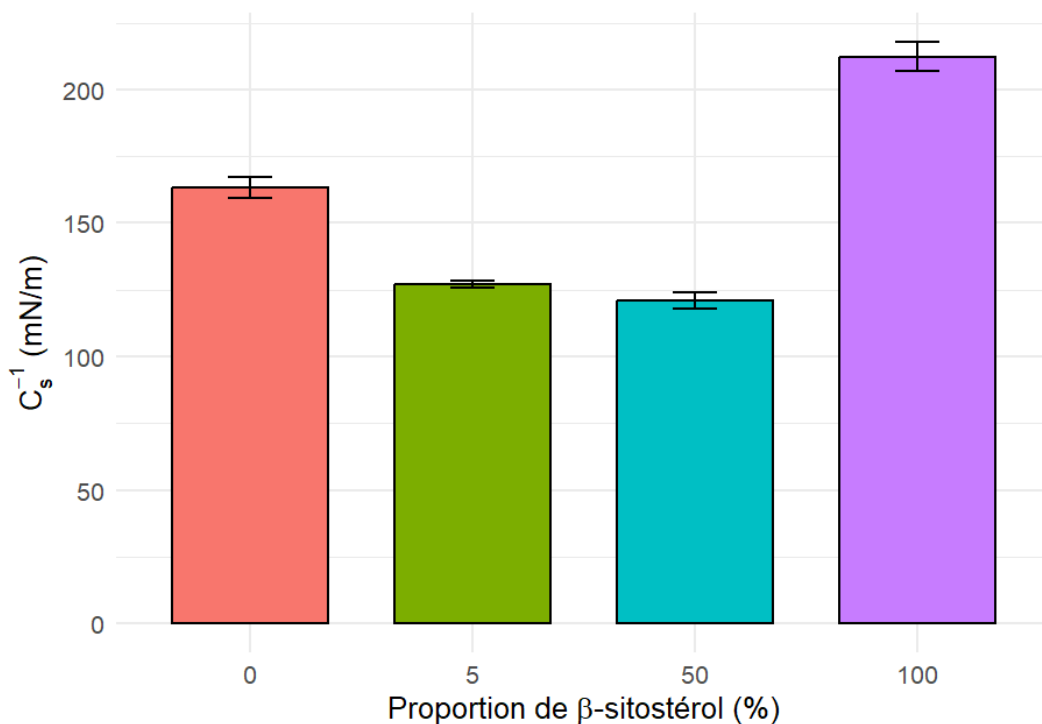


Figure 10. boxplots des C_s^{-1} pour les mélange binaires chol/sito

La Figure 11 et le Tableau 4 présentent les isothermes de compression et les paramètres caractéristiques correspondants pour le mélange ternaire POPC/SM/Chol 1 :1 :1 et les mélanges quaternaires POPC/SM/chol/sito 1:1:0,95:0,05 et POPC/SM/chol/sito 1:1:1:0,5;0,5.

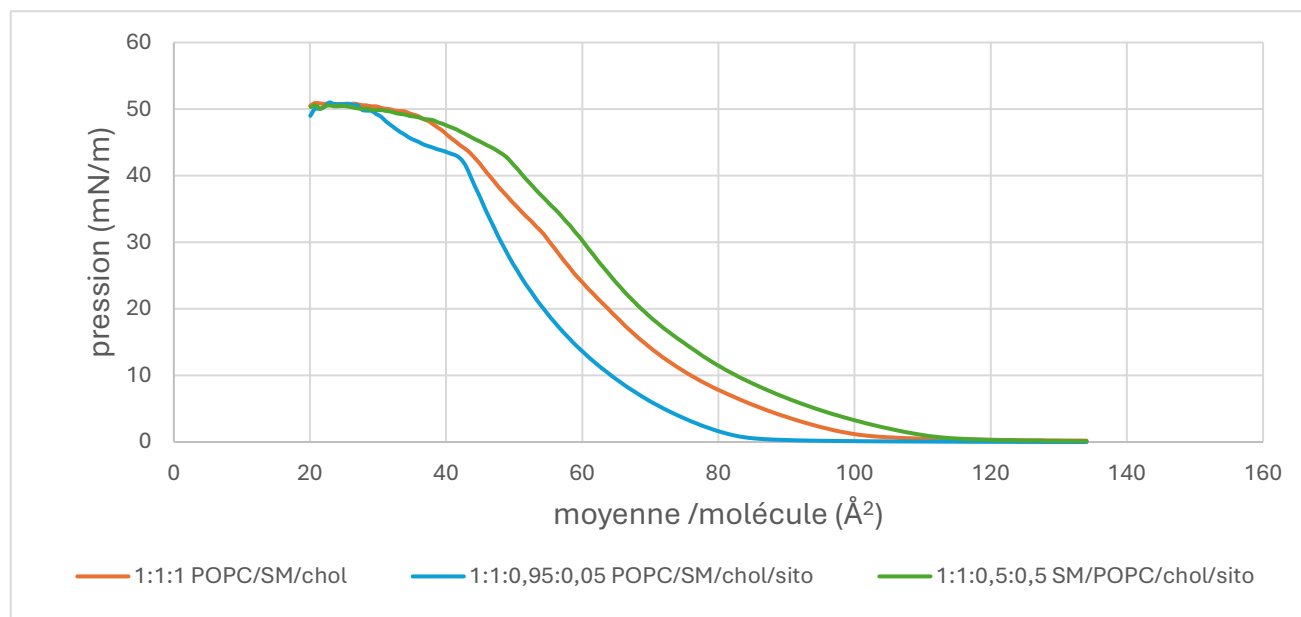


Figure 11. Pression de surface en fonction de l'aire moyenne occupée par une molécule du mélange 1 : 1 : 1 POPC/SM/chol, du mélange 1 : 1 : 0,95 : 0,05 POPC/SM/chol/sito et du mélange 1 : 1 : 0,5 : 0,5 POPC/SM/chol/sito

Tableau 4. Aire au take-off, aire au collapse, pression au collapse et module de compressibilité pour le mélange POPC/SM/chol 1 : 1 : 1, le mélange POPC/SM/chol/sito 1 : 1 : 0,95 : 0,05 et le mélange POPC/SM/chol/sito 1 : 1 : 0,5 : 0,5

	A_0 (\AA^2)	A_c (\AA^2)	Π_c (mN/m)	C_s^{-1} (mN/m)
1:1:1	$94,8 \pm 2,2$	$38,3 \pm 1,4$	$46,2 \pm 1,4$	$68,0 \pm 1,9$
1:1:0,95:0,05	$79,7 \pm 0,7$	$41,1 \pm 1,9$	$43,2 \pm 0,9$	$67,7 \pm 13,6$
1:1:0,5:0,5	$113,2 \pm 3,7$	$49,6 \pm 0,4$	$43,3 \pm 0,3$	$61,4 \pm 5,5$

Concernant le mélange ternaire POPC/SM/Chol (sans substitution) et les mélanges quaternaires avec substitution partielle du cholestérol par le β -sitostérol, il existe entre chaque modèle une différence très hautement significative au niveau des valeurs de A_0 . Cependant, les tendances ne sont pas les mêmes si la substitution du cholestérol par le β -sitostérol est faible (5%) ou élevée (50%). Le A_0 à 5% présente un A_0 plus faible que le modèle sans substitution tandis que le A_0 50% montre une valeur plus importante que le A_0 du modèle sans substitution (Tableau 4, Figure 11).

Au vu de ces valeurs de A_0 , les molécules du modèle POPC/SM/chol/sito 1 : 1 : 0,95 : 0,05 occupent en moyenne moins de place dans leur état le plus expansé que dans le modèle POPC/SM/chol 1:1:1 tandis que dans le modèle 1:1:0,5:0,5, elles occupent plus de place.

Concernant, les A_c , il n'existe pas de différence significative entre les modèles POPC/SM/chol 1 : 1 : 1 et son homologue avec 5% de substitution alors que la différence est très hautement significative par rapport au modèle POPC/SM/chol/sito 1 : 1 : 0,5 : 0,5 qui possède une valeur de A_c plus élevée (Tableau 4). Donc, dans le modèle avec 50% de substitution, les molécules occupent plus de place dans leur état plus condensé par rapport au modèle sans substitution et celui avec 5% de substitution. Cela s'explique

par la structure du β -sitostérol avec son groupement éthyle supplémentaire en C24, par rapport au cholestérol.

Concernant la Π_c , il existe une différence significative entre le modèle ternaire (sans substitution) et les modèles quaternaires mais pas entre les modèles quaternaires entre eux. La Π_c est plus élevée pour le modèle ternaire, ce qui indique que la substitution du cholestérol par le β -sitostérol engendre une rupture de la monocouche à une pression plus faible et donc déstabilise la monocouche. Cette déstabilisation de la monocouche ne diffère pas de façon significative selon le taux de substitution (Tableau 4).

L'analyse du C_s^{-1} montre que la substitution de cholestérol par le β -sitostérol n'entraîne pas de variation significative de la rigidité de la monocouche. Ce constat est en accord avec les résultats de Wydro *et al.* (2008)⁵², obtenus dans une expérience similaire réalisée à la même température (20°C) mais avec un pH différent (6,5 sans sel contre 7,4 avec présence de NaCl lors de ce travail de fin d'études). Comme l'ont également observé ces auteurs, l'effet sur C_s^{-1} reste beaucoup moins prononcé que celui d'autres paramètres structuraux dans ces modèles.

5.2.2 Analyse thermodynamique des isothermes de compression des mélanges

Pour mieux comprendre le comportement des mélanges et plus précisément caractériser l'interaction entre le β -sitostérol et le cholestérol, une analyse thermodynamique a été effectuée sur base des équations (1) à (5). Celle-ci consiste à déterminer les paramètres suivants : l'excès d'aire (A^{exc}), l'excès d'énergie libre (ΔG_{exc}) et l'énergie libre de Gibbs du mélange (ΔG_{mix}). Les données pour arriver à ces données sont en annexe 1.

Un A^{exc} égal à zéro est un mélange idéal, les molécules dans le film sont alors soit totalement miscibles, soit totalement immiscibles⁷⁰. Elles s'organisent indépendamment les unes des autres ; Il n'y a aucune interaction entre-elles.

Lorsque les A^{exc} sont différents de zéro, cela signifie que le mélange se comporte de manière non idéale³. Un A^{exc} négatif indique que les molécules du mélange occupent moins de place que si elles étaient seules. Il y a un empilement plus dense et donc des interactions plus fortes entre les molécules que dans un mélange idéal⁶⁹. Un A^{exc} négatif peut également traduire la formation d'un complexe entre les molécules du mélange⁷⁰. A l'inverse, des valeurs positives de A^{exc} suggèrent une expansion moléculaire et donc des interactions répulsives entre les molécules du mélange, susceptibles de conduire à une séparation de phase partielle ou totale⁶⁹.

Le ΔG_{exc} permet d'évaluer si la monocouche présente une tendance favorable ou défavorable au mélange des composants^{69,70}. Un ΔG_{exc} négatif traduit des interactions attractives entre espèces différentes, favorisant leur association et la formation éventuelle de complexes mixtes. À l'inverse, un ΔG_{exc} positif indique des interactions défavorables, conduisant à la formation de domaines bidimensionnels et à une séparation de phase.

Le ΔG_{mix} , quant à lui, permet de caractériser la stabilité thermodynamique du mélange. Un ΔG_{mix} positif traduit un mélange thermodynamiquement instable tandis qu'un ΔG_{mix} négatif traduit un mélange thermodynamiquement stable.

Le Tableau 5 présente l'analyse thermodynamique des mélanges binaires Chol/sito 95:5 et Cho/sito 50:50.

Tableau 5. Excès d'aire à 20mN/m, excès d'énergie libre de Gibbs et énergie libre de Gibbs du mélange entre 0 et 20 mN/m pour les mélanges 95 :5 chol/sito et 50 :50 chol/sito

Mélange	$A^{exc} (\text{\AA}^2)$	ΔG_{exc} $\times 10^{-23} \text{J/molécule}$	ΔG_{mix} $\times 10^{-23} \text{J/molécule}$
95 :5 chol/sito	13,4	308,3	228,0
50 :50 chol/sito	12,6	261,8	-18,8

Les deux mélanges binaires contenant une proportion de β -sitostérol plus ou moins élevée présentent des valeurs d' A^{exc} positives significativement différentes de zéro. De plus, les ΔG_{exc} pris sur l'intervalle 0 à 20 mN/m, sont tous deux positifs. Ceci indique une expansion moléculaire par rapport à un comportement de mélange idéal traduisant une moindre compatibilité entre les deux stérols et la présence d'interactions répulsives pouvant mener à une séparation partielle ou totale de phase (Tableau 5).

Quant au ΔG_{mix} , celui-ci est positif pour le mélange chol/sito 95:5 mais négatif pour le mélange chol/sito 50 :50. Le fait qu'il soit positif pour le mélange binaire 95:5 chol/sito indique que ce mélange est thermodynamiquement défavorable. Par contre, pour le mélange 50:50 chol/sito son signe négatif indique que le mélange est stable et thermodynamiquement favorable (Tableau 5) .

Le Tableau 6 présente l'analyse thermodynamique du mélange ternaire POPC/SM/chol 1:1:1 et des mélanges quaternaires POPC/SM/Chol/sito 1:1:0,95:0,05 et 1:1:0,5:0,5.

Tableau 6. Excès d'aire à 20 mN/m, excès d'énergie libre de Gibbs et énergie libre de Gibbs du mélange entre 0 et 20 mN/m pour les mélanges 1 :1 :1 POPC/SM/chol, 1 :1 :0,95 :0,05 POPC/SM/chol/sito et 1:1 :0,5:0,5 POPC/SM/chol/sito

Mélange	$A^{exc} (\text{\AA}^2)$	ΔG_{exc} $\times 10^{-23} \text{J/molécule}$	ΔG_{mix} $\times 10^{-23} \text{J/molécule}$
1:1:1 POPC/SM/chol	6,6	141,5	-303,0
1:1:0,95:0,05 POPC/SM/chol/sito	2,0	-69,1	-540,5
1:1:0,5:0,5 POPC/SM/chol/sito	14,7	367,9	-170,2

Les mélanges ternaire et quaternaires présentent des valeurs positives de A^{exc} suggérant des interactions répulsives entre les composés. Cependant, le modèle 1:1:0,95:0,05 POPC/SM/chol/sito présente une valeur A^{exc} proche de zéro qui tend à suggérer que son comportement est quand même proche d'un mélange idéal. Au contraire, le mélange avec 50% de substitution présente le A^{exc} le plus élevé. Cela suggère que les molécules occupent en moyenne plus de place que dans celui sans substitution. La substitution du cholestérol par une faible teneur en β -sitostérol favoriserait donc une organisation indépendante des molécules les unes par rapport aux autres tandis qu'une proportion plus élevée engendrerait des interactions répulsives plus fortes entre celles-ci (Tableau 6).

Si on compare à la littérature, Wydro (2008) a montré, pour le même modèle lipidique, des valeurs de A^{exc} à 32 mN/m négatives qui augmentent vers le positif avec la substitution du cholestérol par le β -sitostérol même pour une substitution à 5% . Nos valeurs de A^{exc} à 32 mN/m montrent les mêmes

tendances que celles à 20 mN/m (annexe 2). Ce résultat apparemment contradictoire avec celui de Wydro peut s'expliquer par la différence de sous-phase utilisée entre les deux expériences.

Alors que Wydro. 2008 a utilisé une sous-phase constituée uniquement d'eau milliQ à pH 6,5, au sein de ce travail, une sous-phase composée de 10mM Tris-HCl 150 mM NaCl à pH 7,4 a été utilisée.

Le ΔG_{exc} positif des modèles POPC/SM/chol 1:1:1 et POPC/SM/chol/sito 1:1:0,5:0,5 (Tableau 6) confirme la tendance ces modèles à présenter une séparation de phase. Le ΔG_{exc} négatif du mélange 1:1:0,95:0,05 POPC/SM/chol/sito indique que les interactions mutuelles entre les différents composants sont plus élevées que les interactions entre les molécules pures elles-mêmes, ce qui entraîne la formation d'une monocouche plus uniforme sans agrégats bidimensionnels.

Les conditions de sous-phase différentes entre notre travail et celui de Wydro³ peuvent également expliquer les différences de signe des ΔG_{exc} pour le mélange substitué à 50%, négatif dans l'étude de Wydro et positif dans notre étude.

Les mélanges composés de POPC/SM/chol avec substitution ou non du cholestérol par le β -sitostérol possèdent tous des ΔG_{mix} négatifs (Tableau 6) qui indique que les modèles sont thermodynamiquement stables et donc que les mélanges sont thermodynamiquement favorables.

5.2.3 Conclusion

En conclusion, la substitution du cholestérol par du β -sitostérol semble globalement engendrer une expansion au sein des mélanges due aux forces répulsives que celui-ci peut créer par rapport à un mélange d'origine (1:1:1 POPC/SM/chol et chol/sito) tout en gardant un mélange thermodynamiquement stable. Cependant, une concentration seuil semble nécessaire. Il serait donc conseillé de tester un plus grand nombre de pourcentages de substitution du cholestérol.

5.3 Evaluation de l'insertion du β -sitostérol dans les membranes biomimétiques

Le comportement d'insertion du β -sitostérol au sein des monocouches POPC/SM/chol présentant des teneurs variables en cholestérol a été évalué au moyen de la technique de balance à film en mode adsorption. Le mélange équimolaire 1:1:1 est utilisé comme modèle de radeau lipidique de cellule saine, tandis que les compositions enrichies (30:30:40 et 20:20:60) miment les radeaux lipidiques associés aux membranes tumorales. Parallèlement, un système DOPC/SM/chol a été étudié afin d'examiner l'influence de la présence de chaînes acyles plus insaturées sur l'insertion du β -sitostérol.

Les lipides sont déposés à l'interface air/tampon de manière à former une monocouche. Une fois stabilisée à une pression de surface choisie, le β -sitostérol est injecté dans la sous-phase.

Un profil de cinétique d'adsorption atypique a été observé, et ce, indépendamment de la pression initiale ou du modèle lipidique (Figure 12). En effet au lieu d'adopter une allure logarithmique comme dans la plupart des modèles (illustré par l'adsorption de la surfactine sous un film lipidique PLPC/sito/DPPC (annexe 3)), la pression de surface atteint très rapidement un maximum et puis décroît avant de se stabiliser. L'augmentation initiale de pression de surface indique que le β -sitostérol est capable de s'adsorber au sein de la monocouche. La décroissance rapide de la pression de surface suggère un réarrangement des lipides présents à l'interface avec possiblement un départ de certaines molécules vers la sous-phase avant d'atteindre un équilibre.

Il a été remarqué que la pression maximale (42 mN/m) correspond à la pression de surface de collapse observée pour le modèle 1:1:1 POPC/SM/chol avec substitution partielle de 5 ou 50% du cholestérol par du β -sitostérol lors des expériences de balance à film en compression (voir chapitre précédent). La pression de collapse correspond à la pression de surface à laquelle la monocouche se réorganise et forme des structures tridimensionnelles⁷¹.

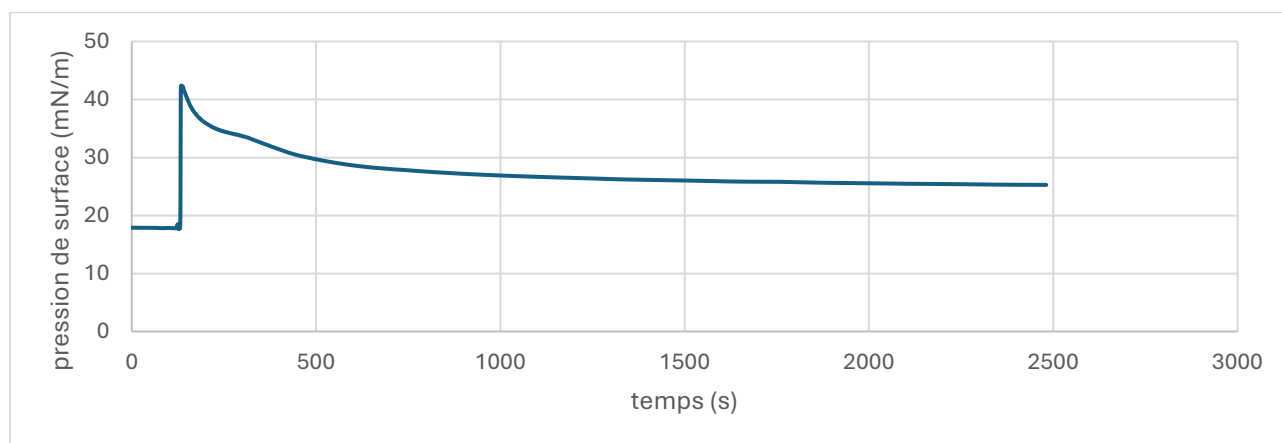


Figure 12. Injection de β -sitostérol (concentration finale d 0,6 μ M) en sous- phase (10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,4 à 25°C) sous une monocouche POPC/SM/chol 1 :1 :1

Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est la possibilité d'une réorganisation du film lipidique, impliquant notamment un remplacement du cholestérol par le β -sitostérol, lequel serait alors relargué en sous-phase. Pour tester cette hypothèse, une méthode de dosage des lipides UHPLC MS/MS à triple

quadrupôle a été développée (voir « Mise au point d'une méthode analytique par UHPLC MS/MS à triple quadrupôle pour la détection et la quantification de lipides »).

Plusieurs courbes de pression de surface en fonction du temps ont été réalisées avec des pressions initiales différentes. Ensuite, un graphe de la pression de surface à l'équilibre en fonction de la pression initiale a été réalisé pour les différents modèles (Figure 13).

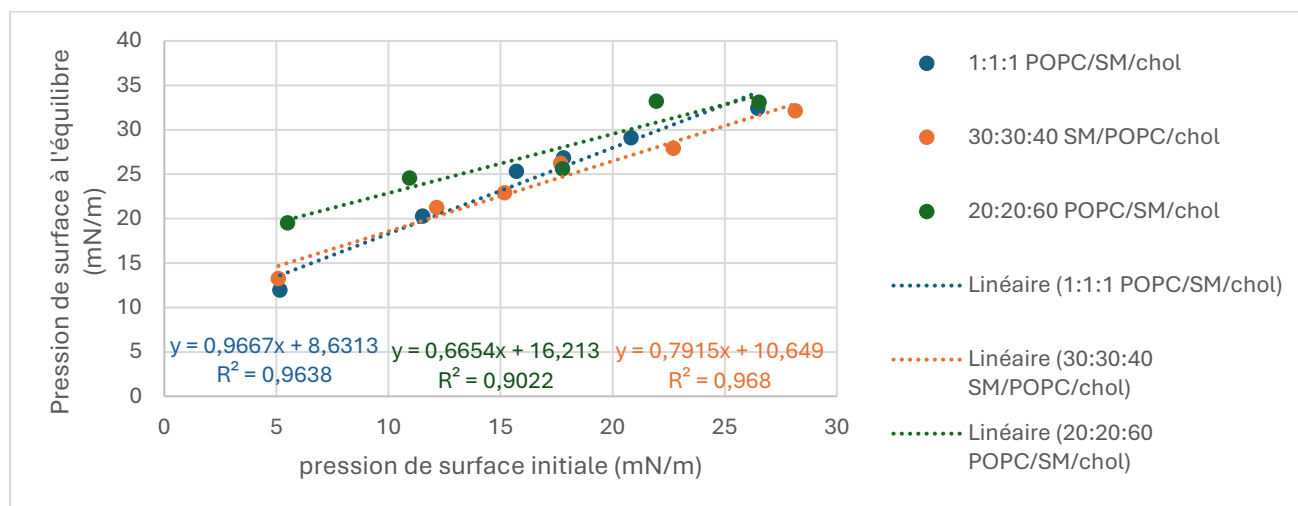


Figure 13. Pression de surface à l'équilibre après injection de β -sitostérol (concentration finale de $0,6\mu M$) en sous-phase (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH 7,4 à $25^\circ C$) en fonction de la pression de surface initiale pour un modèle POPC/SM/chol 1 : 1 : 1, 30 : 30 : 40 et 20 : 20 : 60

Il est observé que la pression de surface initiale de la monocouche, avant injection du β -sitostérol, influence de manière très hautement significative la pression de surface à l'équilibre, indépendamment du modèle lipidique. Plus la pression de surface initiale est haute, plus la pression de surface à l'équilibre est élevée.

La comparaison des modèles POPC/SM/Chol de composition 1:1:1, mimant une membrane avec radeaux lipidiques d'une cellule non cancéreuse, et 30:30:40, représentant celle d'une cellule cancéreuse, (Figure 13) ne montre pas de différence significative en termes de pentes (dépendance de l'effet du β -sitostérol à la compacité initiale de la monocouche) et d'ordonnées à l'origine des droites (impact de l'injection lorsque la monocouche est la moins condensée). Ceci signifie qu'il n'existe pas de différence significative au niveau du comportement de réarrangement des monocouches POPC/SM/Chol 1:1:1 et 30:30:40 après l'adsorption du β -sitostérol.

Contrairement au modèle 30:30:40, le modèle 20:20:60 a révélé une différence significativement plus élevée au niveau de l'ordonnée à l'origine par rapport au modèle 1:1:1. Cette différence pourrait traduire un réarrangement moléculaire plus limité ou une perte de lipides vers la sous-phase plus faible dans ce modèle. Cela peut s'expliquer par le fait qu'un taux plus élevé de cholestérol, entraîne un empaquetage plus élevé, limitant ainsi l'ampleur du réarrangement^{30,55}. Les pentes ne sont, quant à elles, pas significativement différentes.

Les courbes ne donnent pas d'information sur le taux de β -sitostérol présent dans la monocouche à la pression de surface à l'équilibre. En effet, l'insertion du β -sitostérol semble la même en fonction du modèle étudié puisque la pression maximale de 42 mN/m est atteinte pour tous les modèles. Une analyse de la sous-phase par l'UHPLC-MS-MS pourra aider à connaître les lipides qui ont quitté la monocouche après injection du β -sitostérol et par déduction, la composition de la monocouche (voir

section « Mise au point d'une méthode analytique par UHPLC MS/MS à triple quadrupôle pour la détection et la quantification de lipides »).

Ensuite, le modèle 1:1:1 DOPC/SM/chol a été testé dans les mêmes conditions. Le DOPC, contrairement au POPC n'est pas retrouvé au sein des membranes plasmiques humaines mais est très souvent utilisé au sein des modèles expérimentaux (Figure 14). Le DOPC, tout comme le POPC contribue au contrôle mésoscopique de la taille des domaines membranaires. Cependant, alors que le POPC n'induit que des hétérogénéités nanométriques de type liquide ordonné + liquide désordonné au sein de mélanges ternaires contenant du cholestérol et de la sphingomyéline, le DOPC est capable de générer des domaines fluides de taille micrométrique. Cela peut être expliqué par leur différence de structure. Alors que le POPC possède une chaîne saturée 16:0 et une chaîne insaturée 18:1, le DOPC possède deux chaînes insaturées 18:1⁶⁸. Ces chaînes insaturées perturbent l'alignement et forment un coude, ce qui réduit l'empaquement serré avec la sphingomyéline et le cholestérol^{68,72}.

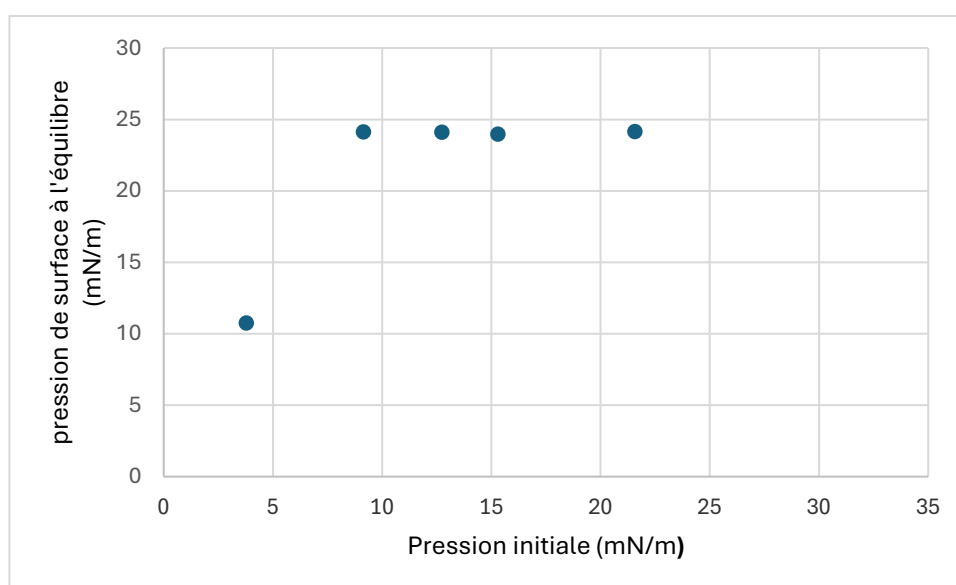


Figure 14. Pression de surface à l'équilibre après injection de β -sitostérol (concentration finale de $0,6\mu M$) en sous-phase ($10mM$ Tris-HCl, $150mM$ NaCl pH 7,4 à $25^{\circ}C$) en fonction de la pression de surface initiale pour un modèle DOPC/SM/chol 1 :1 :1

Après injection du β -sitostérol sous la monocouche contenant du DOPC, un comportement différent est observé par rapport au système renfermant du POPC. En effet, bien que la pression maximale atteinte reste toujours la même ($42mN/m$), la pression de surface à l'équilibre atteint $25mN/m$, quelle que soit la pression de surface initiale (excepté le premier point aux alentours de $5mN/m$). Une hypothèse pourrait être que, du fait de ses deux chaînes insaturées, le DOPC induit un empaquement moins dense, facilitant ainsi le réarrangement de la monocouche⁶⁸ (Figure 14).

Il a été décidé de garder le modèle 1:1:1 POPC/SM/chol mimant une membrane renfermant des radeaux lipidiques d'une cellule saine et le modèle 20:20:60 POPC/SM/chol mimant celle avec radeaux lipidiques d'une cellule cancéreuse puisqu'il existe une différence significative entre ces deux modèles.

5.4 Mise au point d'une méthode analytique par UHPLC MS/MS à triple quadrupôle pour la détection et la quantification de lipides

5.4.1 Mise en contexte

Cette section présente la mise au point d'une méthode MRM UHPLC MS/MS à triple quadrupôle pour détecter et quantifier les lipides membranaires qui auraient filé de la monocouche lipidique vers la sous-phase dans les expériences de balance à film en mode adsorption. Ce développement méthodologique intervient suite à l'observation d'un comportement surprenant lors de l'enregistrement des courbes de la pression de surface en fonction du temps. En effet, une pression maximale est atteinte en quelques secondes après injection du β -sitostérol en sous-phase puis diminue progressivement. Cela suggère que le β -sitostérol ou un autre lipide de la monocouche serait transféré vers la sous-phase. La méthode permettrait ainsi de confirmer ou infirmer ce transfert et d'identifier précisément le ou les lipide(s) concerné(s).

Avant de réaliser une MRM, plusieurs étapes sont nécessaires pour optimiser la détection et la quantification des analytes dans le but d'améliorer la sensibilité et la sélectivité, tout en réduisant les interférences et en assurant des mesures fiables et reproductibles.

5.4.2 Recherches préalables

Lors de l'analyse chromatographique, les molécules d'intérêt s'ionisent et sont détectées sous forme d'adduits. Afin d'identifier l'ensemble des adduits potentiels dans les chromatogrammes, des recherches préalables ont été réalisées.

Les recherches préalables sur la base de données PubChem (NIH) ont permis de construire le Tableau 7. Celui-ci présente des masses calculées à titre purement théorique, dans la mesure où tous les adduits ne se forment pas nécessairement en conditions expérimentales.

Tableau 7. Masses moléculaires et masses des potentiels ions pouvant être observés en ESI⁺ et ESI⁻

Composé	Masse molaire (g/mol)	Masse monoisotopique (Da)	[M + H] ⁺	[M + Na] ⁺	[M + NH ₄] ⁺	[M + HCOOH + H] ⁺	[M + H - H ₂ O] ⁺	[M - H] ⁻	[M + HCOO] ⁻
Cholestérol	386,6	386,3549	387,3622	409,3447	404,3887	433,36504	369,3596	385,3471	430,3453
β -Sitostérol	414,7	414,3862	415,3935	437,3760	432,4200	460,3917	397,3829	413,3784	458,3766
POPC	760,1	759,5778	760,5851	782,5676	777,6116	806,5906	743,5823	758,5700	803,5676
DOPC	786,1	785,5935	786,6008	808,5833	803,6273	832,6063	769,5975	784,5857	829,5833
Sphingomyéline	731,1	730,5989	731,6062	753,5887	748,6327	776,6044	714,6035	729,5911	774,5887
PLPC	758,1	757,5621	758,5694	780,5519	775,5959	803,5676	740,5588	756,5543	801,5519
Ergostérol	396,6	396,3392	397,3465	419,3290	414,370	443,3730	379,3359	395,3314	440,3295

Leur formation dépend entre autres, de la composition de la phase mobile utilisée. Les adduits sodium ont été pris en compte afin d'évaluer la possibilité de leur formation dans les échantillons, due à la présence de NaCl dans le tampon employé lors des expériences de balance à film en adsorption. De même, les adduits ammonium, formiate et acide formique protoné ont été intégrés en prévision d'une phase mobile contenant du formiate d'ammonium et de l'acide formique.

5.4.3 Réalisation des analyses en SCAN-mode : comparaison ESI+ et ESI-

Les modes ESI positif et négatif ont été comparés afin de déterminer les conditions d'ionisation offrant la meilleure sensibilité pour l'analyte en vue de l'analyse MRM.

Afin d'identifier les lipides, au sein des échantillons distincts, une analyse en mode scan a été réalisée. L'analyse en mode scan est utilisée pour détecter les ions précurseurs. Ce mode sélectionne successivement tous les rapports masse sur charge (m/z) au sein de l'analyseur de masse.

Les deux modes d'ionisation par électrospray, en polarités positive et négative ont été évalués (Figure 15 et annexe 4) .

L'ESI est une méthode d'ionisation douce qui utilise l'énergie électrique pour ioniser les molécules en solution et transférer les ions ainsi formés vers la phase gazeuse avant leur analyse en spectrométrie de masse. Celle-ci peut être positive (ESI(+)) avec formation d'ions chargés positivement) ou négative (ESI(-)) avec formation d'ion chargé négativement)⁷³.

L'ESI(-) présente l'avantage de limiter la formation d'adduits, en particulier liés aux cations. Néanmoins, dans le cadre de l'analyse lipidique, de nombreuses études montrent que l'ESI(+) fournit généralement une meilleure sensibilité et une couverture plus large des classes lipidiques^{57,74}.

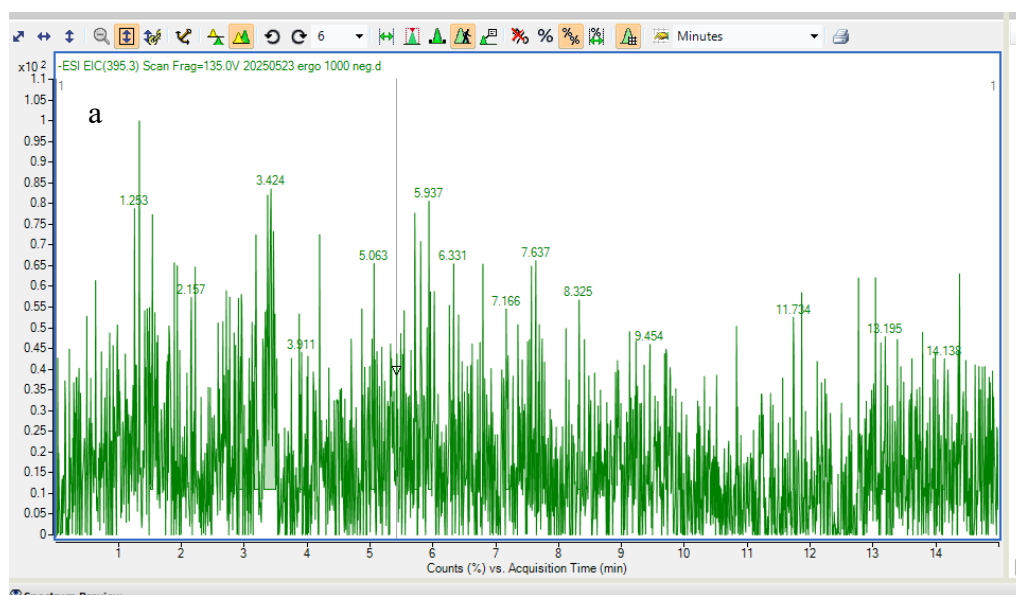
De fait, en mode négatif, lors de l'analyse, aucun ion n'a été détecté pour les deux standards, PLPC et ergostérol. Par contre, en mode positif, la sensibilité est supérieure pour les lipides neutres testés. En effet, chacun des composés présente un ion avec une intensité absolue plus élevée (Figure 15). Il s'agit du fragment $[M + H - H_2O]^+$, 397,3 pour l'ergostérol et $[M + H]^+$, 758,6 pour le PLPC (annexe 4).

Les différents chromatogrammes présentés sont :

- L'EIC (Extracted Ion Chromatogram) est un chromatogramme obtenu à partir du mode SCAN en ne conservant que l'intensité d'un ion spécifique. Il est dérivé du TIC (Total Ion Chromatogram), qui correspond à la somme des intensités de tous les ions détectés à chaque instant, en isolant uniquement le signal du fragment d'intérêt.

- le spectre de masse qui résulte de l'intensité du fragment en fonction du rapport m/z .

Pour cette section les EIC en ESI- et ESI+ de l'ergostérol seront présentés avec l'ion présentant la plus grande intensité bien que tous les ions plausibles du tableau aient été recherchés



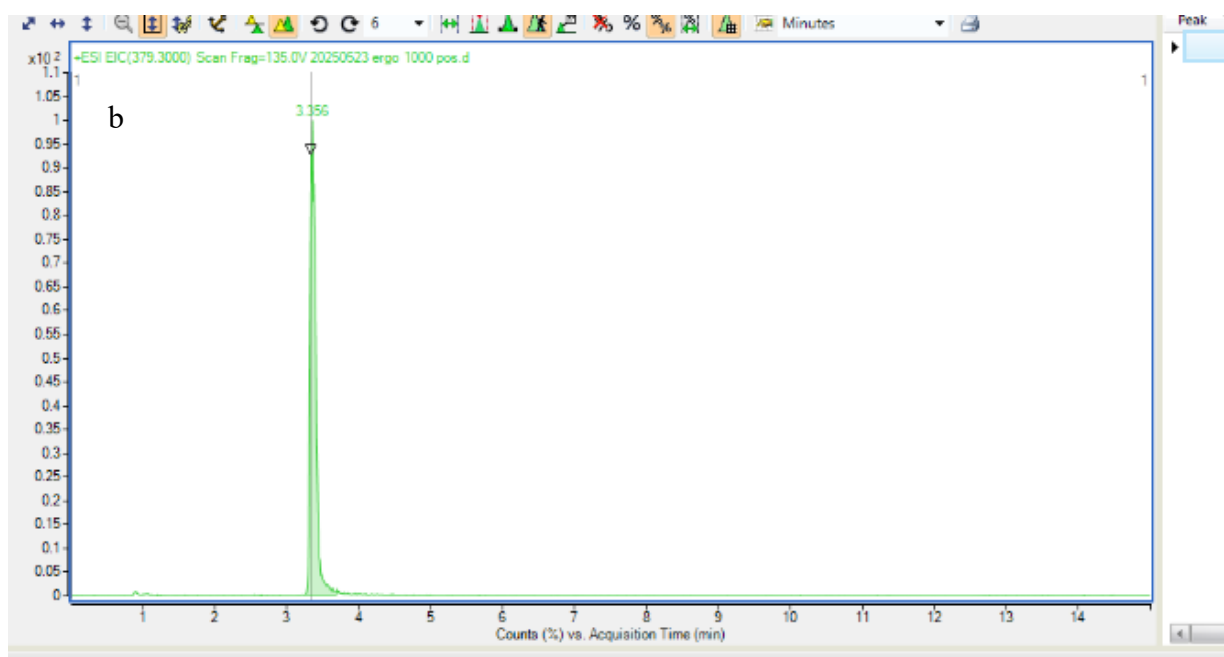


Figure 15. Chromatogrammes de l'ergostérol en mode scan a.. EIC 395,3 ESI⁻ b. EIC 397,3 ESI⁺

Les EIC en ESI⁺ et en ESI⁻ du PLPC avec les ions recherchés présentant la plus grande intensité sont présentés en annexe 4.

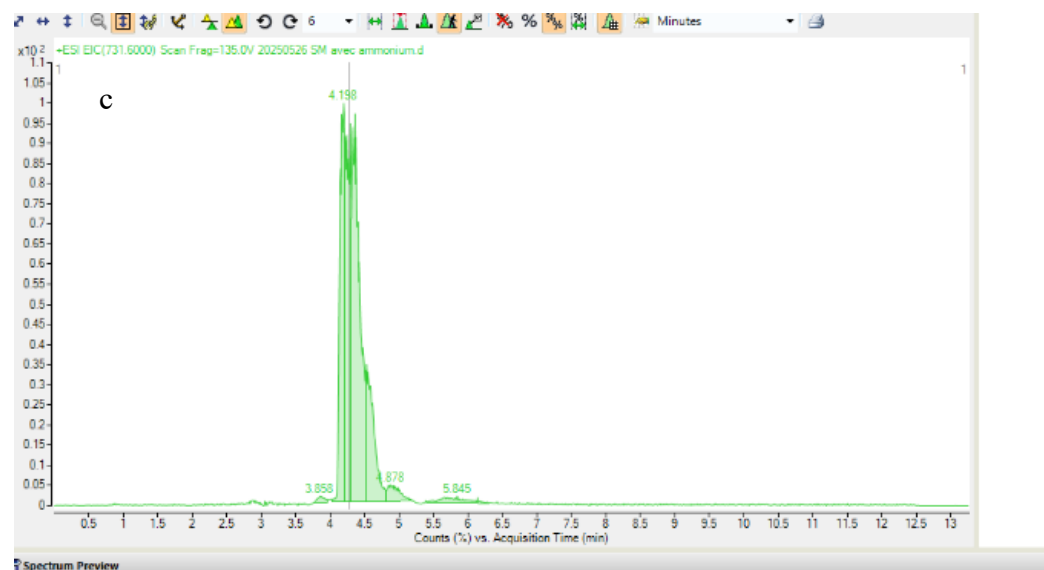
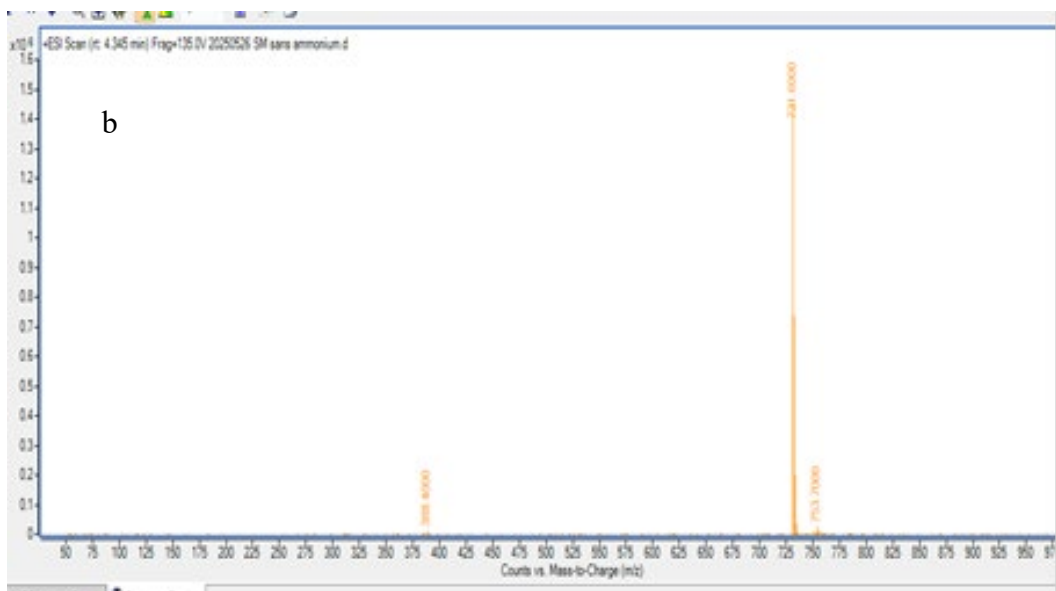
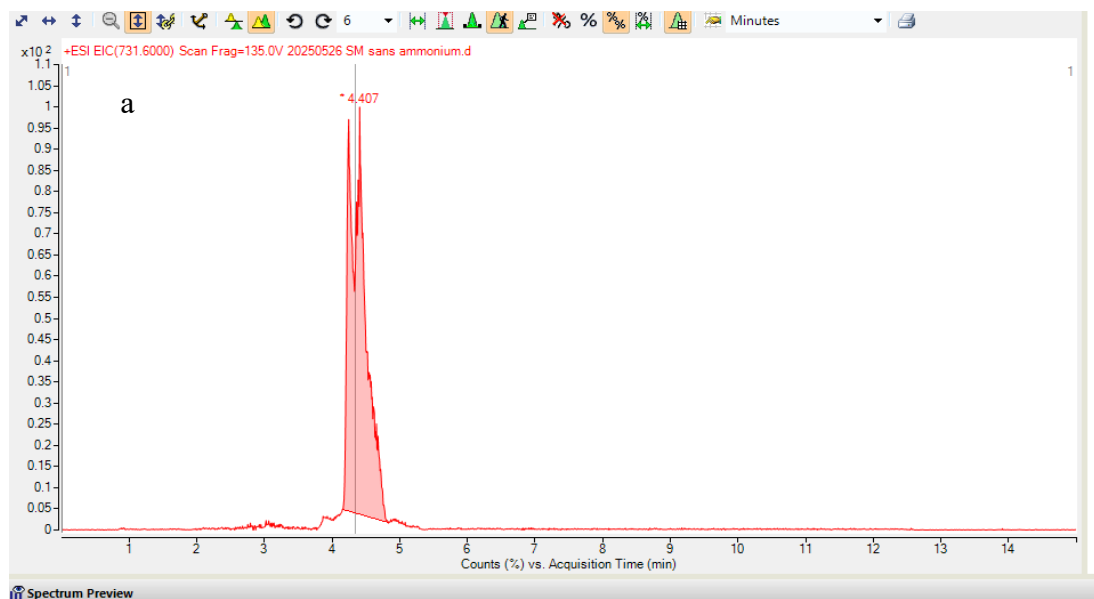
5.4.4 Réalisation des analyses en SCAN-mode : comparaison des phases mobiles avec et sans formiate d'ammonium

Différentes phases mobiles ont été testées afin d'améliorer l'efficacité de séparation et la symétrie des pics chromatographiques.

Cette analyse en mode scan a été réalisée afin d'identifier l'ion précurseur optimal pour le passage en mode MRM.

Une comparaison des phases mobiles, avec et sans formiate d'ammonium, a été effectuée pour tous les composés. Cette analyse fait suite aux travaux de Cajka et Fienh (2016), qui ont montré que l'utilisation de phases mobiles contenant du formiate d'ammonium permettait d'optimiser davantage le dosage des lipides, permettant d'analyser un plus grand nombre de lipides avec la même phase mobile ⁵⁷.

Tous les composés ont été testés mais un stérol, un PC et la sphingomyéline sont présentés, les autres chromatogrammes étant en annexes 5,6,7 et 8. Pour chaque groupe de composés, un EIC de l'ion le plus abondant ainsi que le spectre m/z correspondant sont présentés.



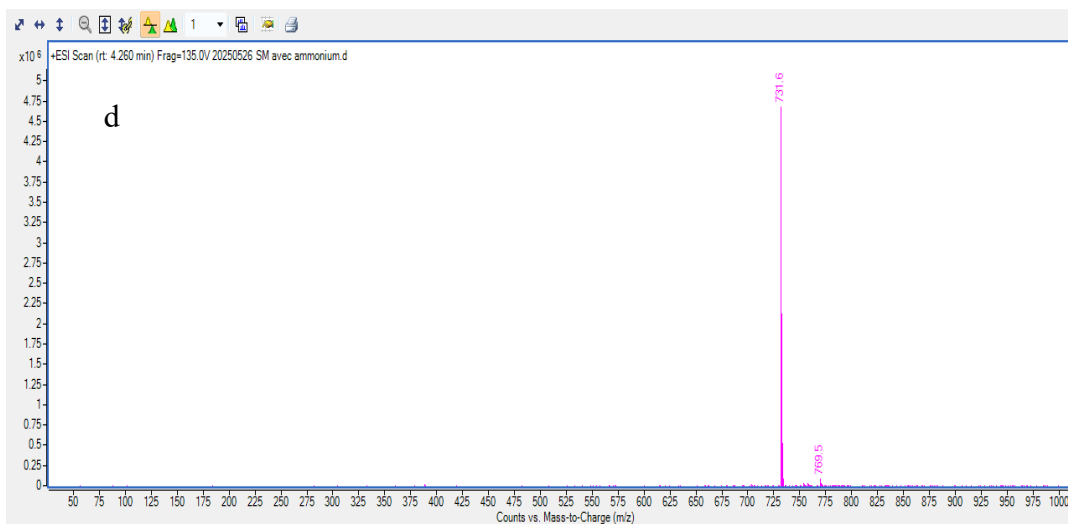
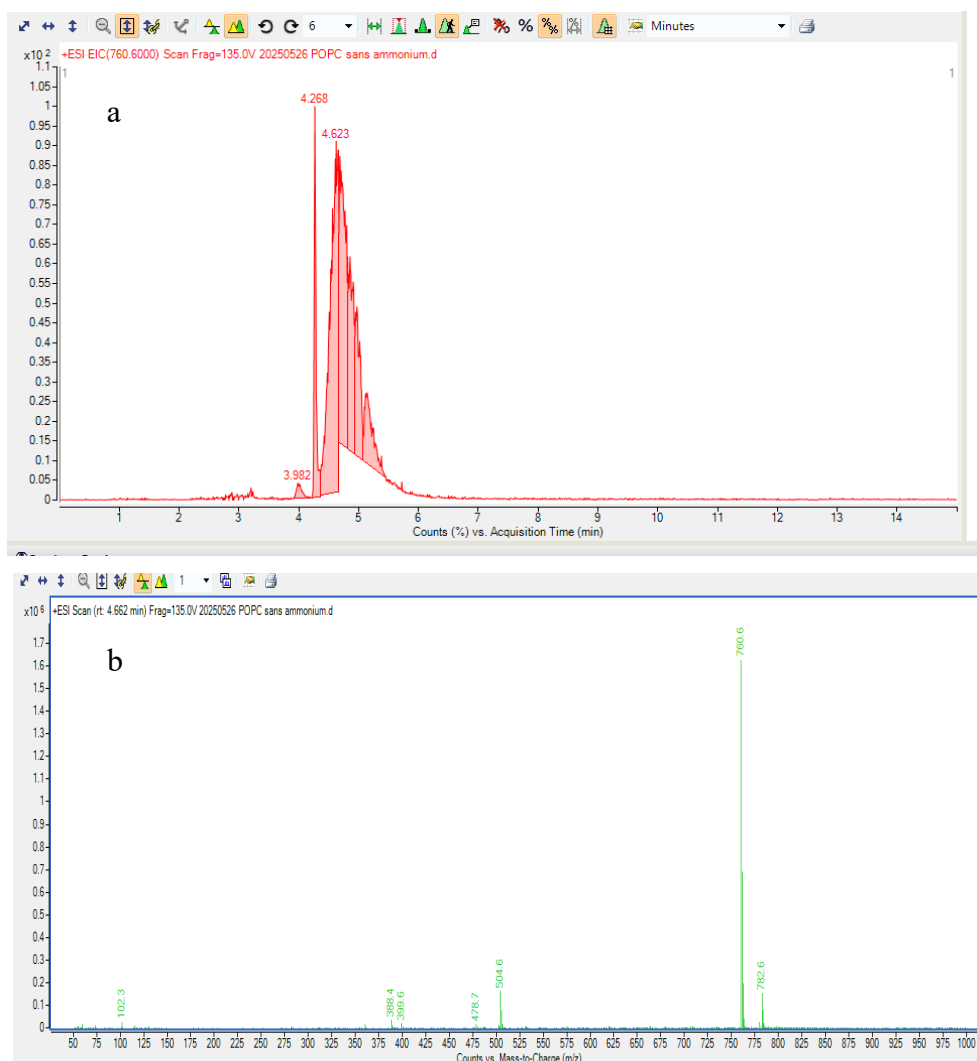


Figure 16. Chromatogramme a. EIC 731,6 sphingomyéline sans formiate d'ammonium b. spectre de masse de la sphingomyéline sans formiate d'ammonium c. EIC 731,6 sphingomyéline avec formiate d'ammonium d. spectre de masse de la sphingomyéline avec formiate d'ammonium



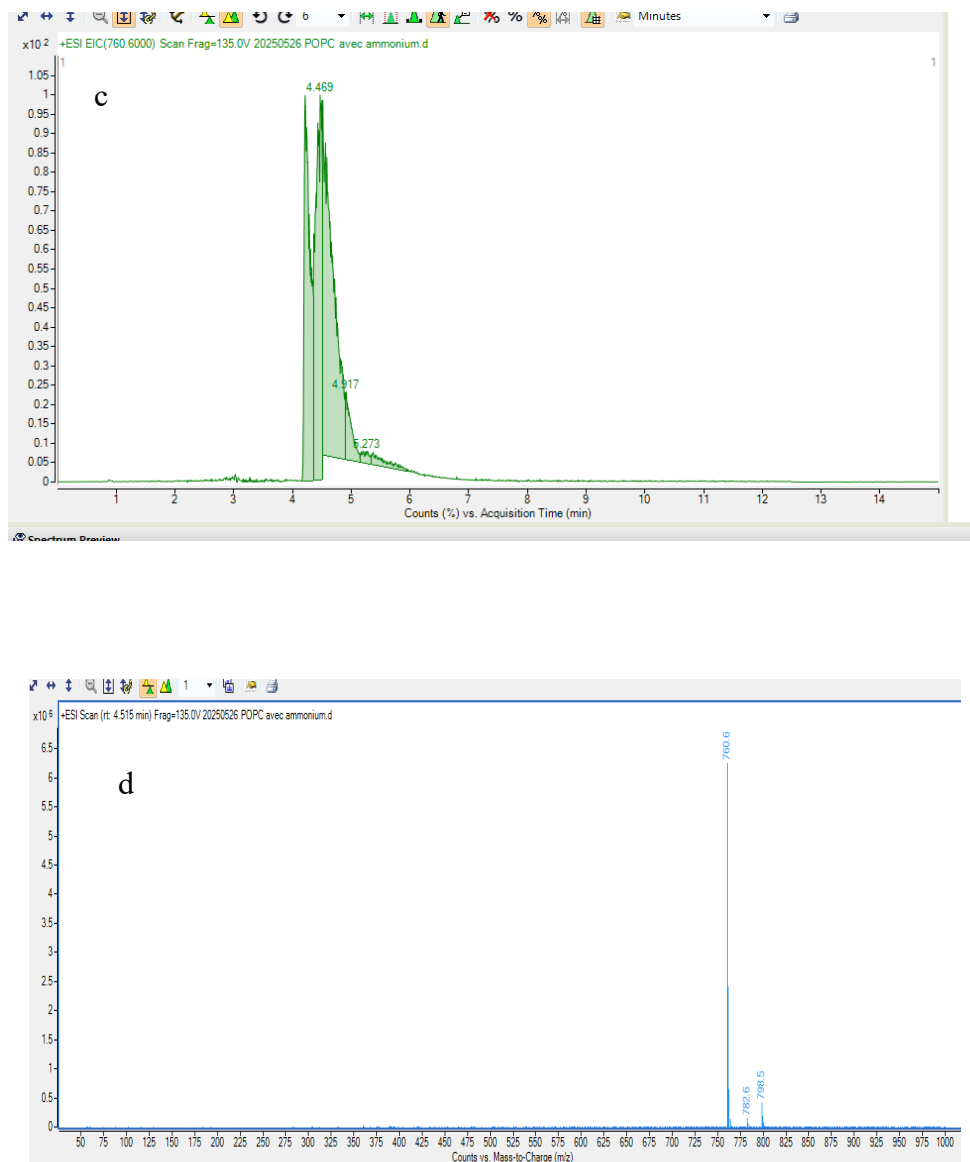
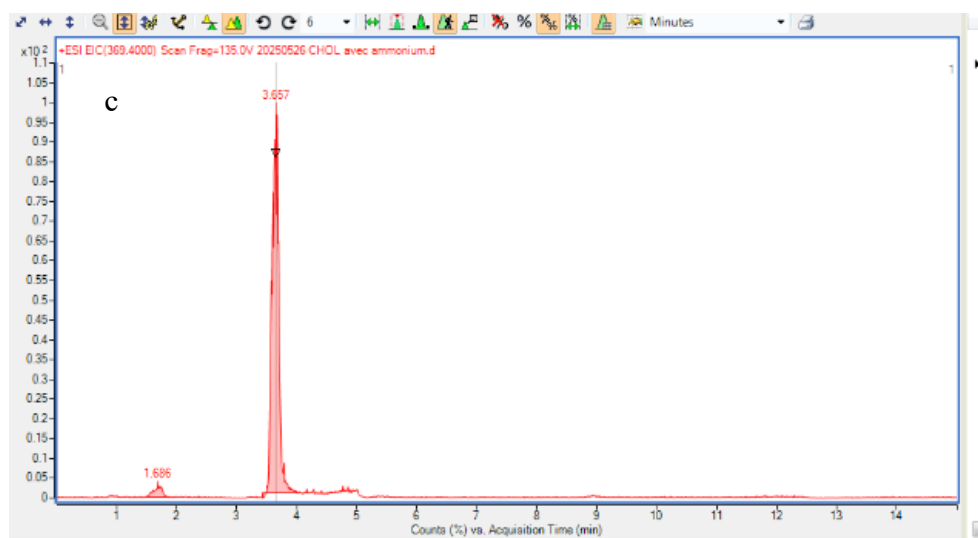
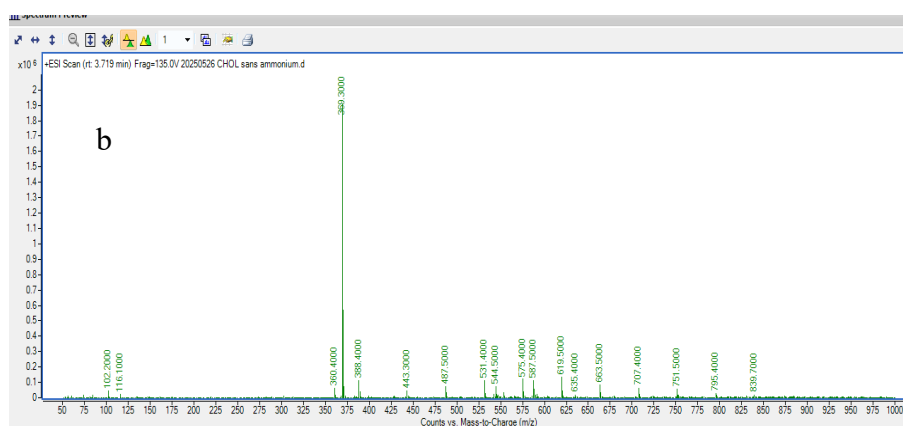
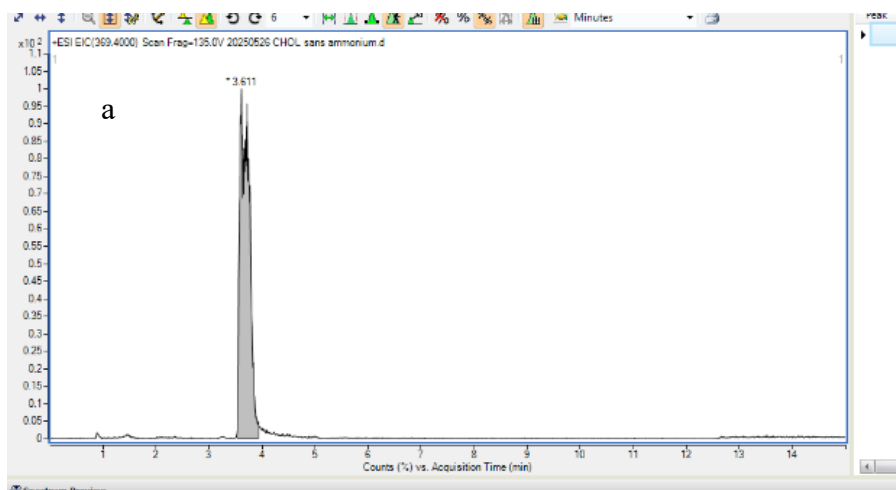


Figure 17. Chromatogrammes a. EIC 760,6 POPC sans formiate d'ammonium b. spectre de masse du POPC sans formiate d'ammonium c. EIC 760,6 POPC avec formiate d'ammonium d. spectre de masse du POPC avec formiate d'ammonium

Le choix de poursuivre avec des phases mobiles contenant du formiate d'ammonium se fonde principalement sur l'analyse des profils des pics des phosphatidylcholines et de la sphingomyéline qui sont plus intenses en présence de formiate d'ammonium, ce qui n'est pas le cas pour les stérols (Figure 16 b et d, Figure 17b et d, Figure 18b et d). Le formiate d'ammonium a permis d'obtenir des pics plus symétriques pour le cholestérol (Figure 18a et c).



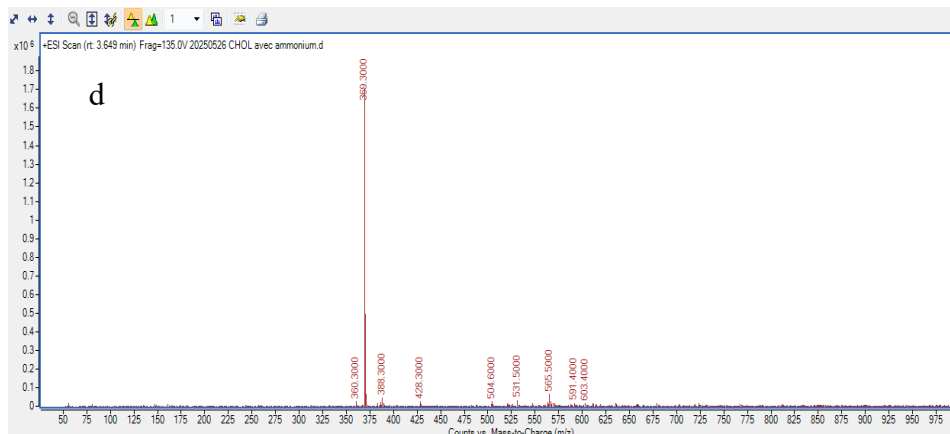


Figure 18. chromatogrammes a. EIC 369,4 cholestérol sans formiate d'ammonium b.spectre de masse du cholestérol sans formiate d'ammonium c. EIC 369,4 cholestérol avec formiate d'ammonium d. spectre de masse du cholestérol avec formiate d'ammonium

Pour la sphingomyéline et les phosphatidylcholines, en mode ESI+, l'ion le plus abondamment détecté correspond à l'ion $[M-H]^+$, qu'il y ait ou non du formiate d'ammonium dans les phases mobiles. Pour les stérols, par contre, une perte d'eau systématique a été observée, rendant l'ion $[M+H-H_2O]^+$ majoritaire en présence ou non de formiate d'ammonium^{75,76}. Lors de cette étape, les temps de rétention ont également pu être identifiés (Tableau 8, Figure 16, Figure 17, Figure 18, annexes 5 à 8)

5.4.5 Détermination de l'ion fragment à partir de l'ion précurseur

L'acquisition en mode product ion a permis de sélectionner les transitions les plus spécifiques et sensibles pour la détection en MRM.

Sur la base des résultats obtenus en mode scan complet, les ions précurseurs (Figure 16, Figure 17, Figure 18 et annexes 5 à 8) ont été identifiés afin de réaliser les analyses de type product ion qui permettent de déterminer les couples ion précurseur/ion fragment (Tableau 8 et annexes 9 à 11)

L'analyse en mode product ion permet de sélectionner un fragment et de le refragmenter de nouveau afin d'identifier son ion fragment le plus abondant grâce à l'analyse SCAN pour le fragment.

Tableau 8. Ions précurseurs et leurs fragments ciblés ainsi que leur temps de rétention

Composé	Ion précurseur identifié	Ion fragment	Temps de rétention du fragment (min)
Cholestérol	369,4	161,0	3,6
β -sitostérol	397,4	161,0	3,9
Ergostérol	379,4	125,0	3,4
POPC	760,6	184,0	4,3
DOPC	786,6	184,0	4,3
PLPC	757,6	184,0	3,9
SM	731,6	184,0	4,2

Pour la sphingomyéline et les phosphatidylcholines, l'ion fragment obtenu, m/z 184, issu de la tête phosphocholine, est un fragment caractéristique⁷⁹ (Tableau 8 et annexes 9 à 11).

Concernant les stérols, les fragments 125 sont retrouvés dans la littérature pour l'ergostérol contre les fragments 161 pour le cholestérol et le β -sitostérol^{77,78,80}. Ces fragments sont également des fragments typiques des stérols par clivage du noyau stéroïdien (Tableau 8 et annexes 9 à 11) ^{80,81} .

Aucun ion fragment n'a été détecté pour le cholestérol. Une hypothèse est que les stérols peuvent parfois rencontrer des difficultés à s'ioniser et qu'une dérivation est parfois nécessaire pour arriver à un résultat concluant⁸⁰. Finalement, son fragment a été défini lors de l'optimisation (optimisation des paramètres).

5.4.6 Optimisation des paramètres

Ensuite, une optimisation de la méthode a été effectuée dans le but d'améliorer la sensibilité, la sélectivité, la séparation. Les paramètres suivants ont été optimisés: l'énergie de collision (CE), la tension du fragmenteur, la pression du nébuliseur, la tension de la buse, la tension du capillaire, le temps de mesure et la tension d'accélération de la cellule.

La CE et la tension du fragmenteur sont propres à chaque composé.

La CE correspond à la tension appliquée au sein de la cellule de collision pour induire la fragmentation contrôlée d'un ion précurseur (Tableau 9)⁸²

La tension du fragmenteur est la tension appliquée en amont de la cellule de collision, dans la source ou l'interface, qui permet de contrôler l'énergie cinétique des ions afin d'éviter une fragmentation prématurée et de préserver l'ion précurseur (Tableau 9)⁸³ .

Tableau 9. valeurs déterminées par optimisation de la méthode pour l'énergie de collision et la tension du fragmenteur

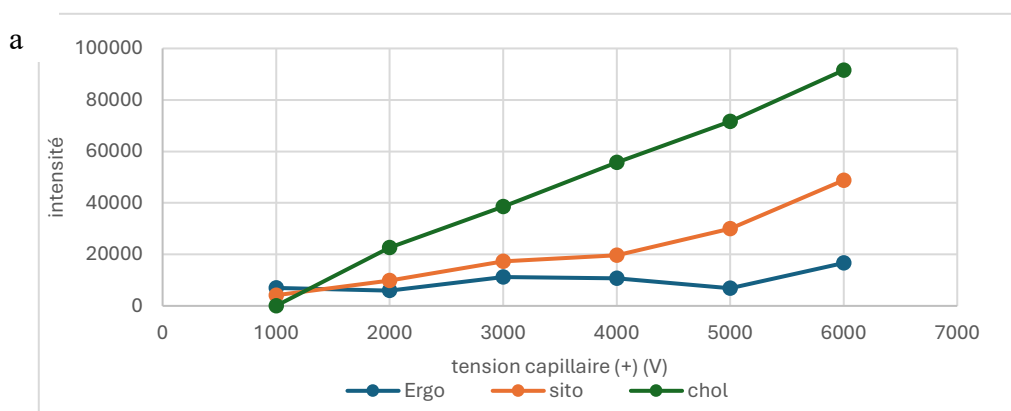
Composé	CE (V)	Fragmenteur (V)
Cholestérol	25	130
β -sitostérol	30	135
Ergostérol	8	108
POPC	33	213
DOPC	33	228
PLPC	33	215
Sphingomyéline	30	210

Quant au temps d'analyse et à la tension d'activation de collision, ceux-ci ont respectivement été fixé à 20 millisecondes et 5 volts pour tous les composés.

Pendant les 20 millisecondes de temps d'analyse, le spectromètre de masse enregistre le signal d'une transition ionique spécifique au sein de chaque cycle d'acquisition⁸⁴.

La tension d'activation de collision, fixée à 5 volts, permet ainsi d'accélérer les ions précurseurs à l'entrée la cellule de collision, favorisant leur fragmentation en ions caractéristiques⁸⁵.

Cependant, certains paramètres étant communs à tous les composés, certains compromis ont dû être trouvés afin d'obtenir la plus grande intensité possible puisque l'optimum ne se trouve pas toujours à la même valeur pour les différents composés. Pour se faire, ces paramètres (la pression du nébuliseur, la tension de la buse et la tension capillaire) ont été représentés sous forme de graphes.



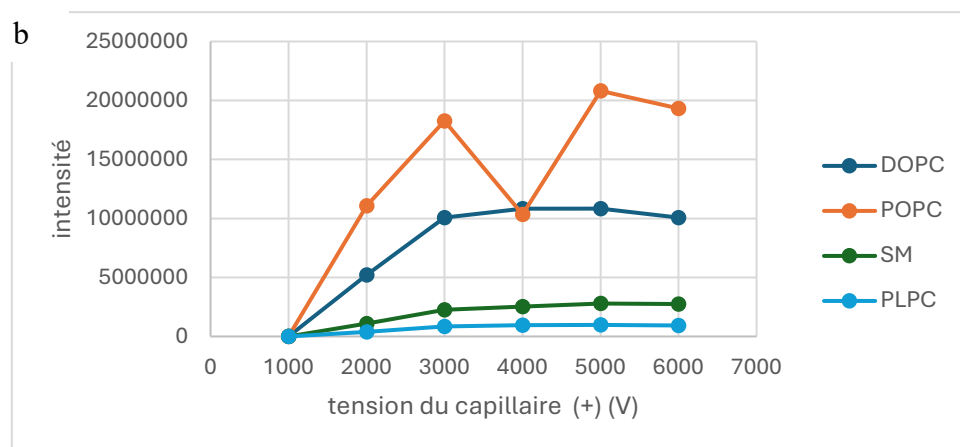
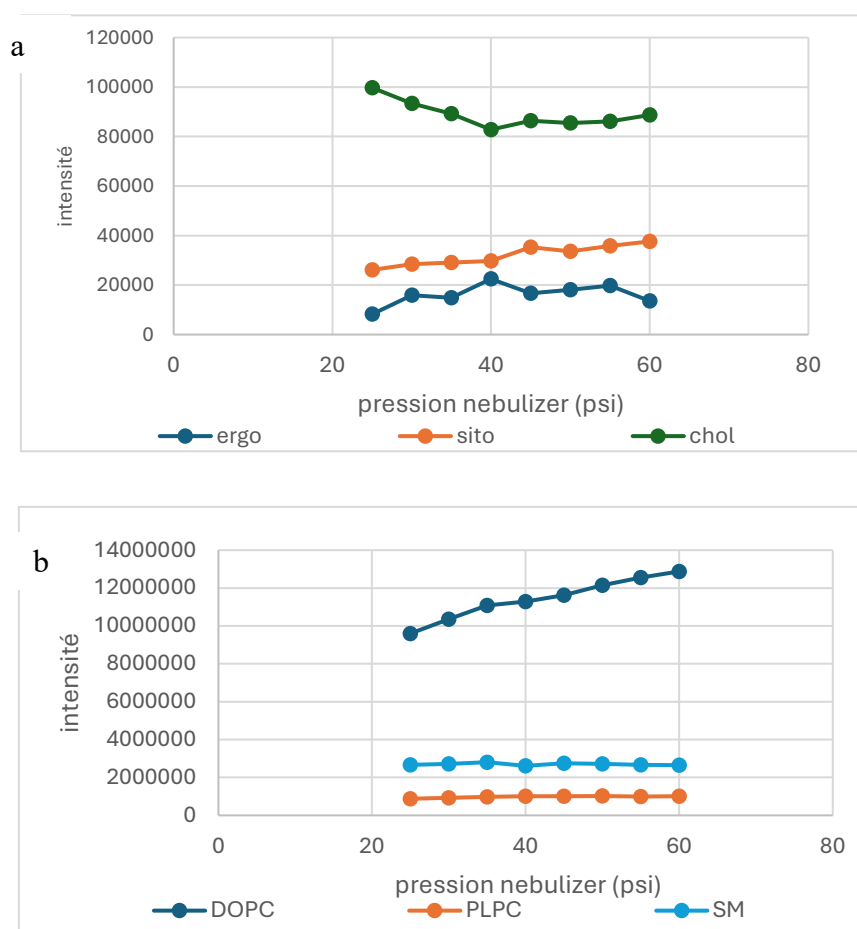


Figure 19. Optimisation de la tension capillaire a. Pour l'ergostérol, le β -sitostérol et le cholestérol b. pour le DOPC, POPC, SM et PLPC

La tension capillaire a été fixée à 6000V, comme compromis optimal pour l'ensemble des composés. Pour le plus grand nombre de composés, cette condition correspond à l'optimum. Même si ce n'est pas strictement l'optimum pour le DOPC et le POPC, leur intensité reste élevée. A cette tension, la formation de gouttelettes chargées issues de l'échantillon liquide est favorisée, ce qui améliore la sensibilité et la stabilité du signal en mode ESI+ (Figure 19).



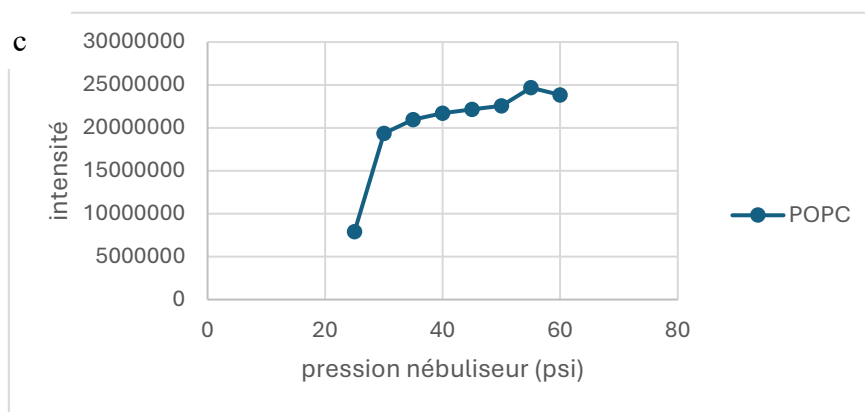


Figure 20. Optimisation de la pression du nébuliseur a. pour l'ergostérol, le cholestérol et le β -sitostérol b ; pour le DOPC, PLPC et la SM c. pour le POPC

Le nébuliseur, réglé à 60 psi, a été sélectionné comme compromis optimal afin de contrôler efficacement la taille et la stabilité des gouttelettes générées à partir de l'échantillon⁸⁶. Bien que cette valeur ne présente pas un optimum pour tous les composés, cela semblait être un bon compromis. (Figure 20).

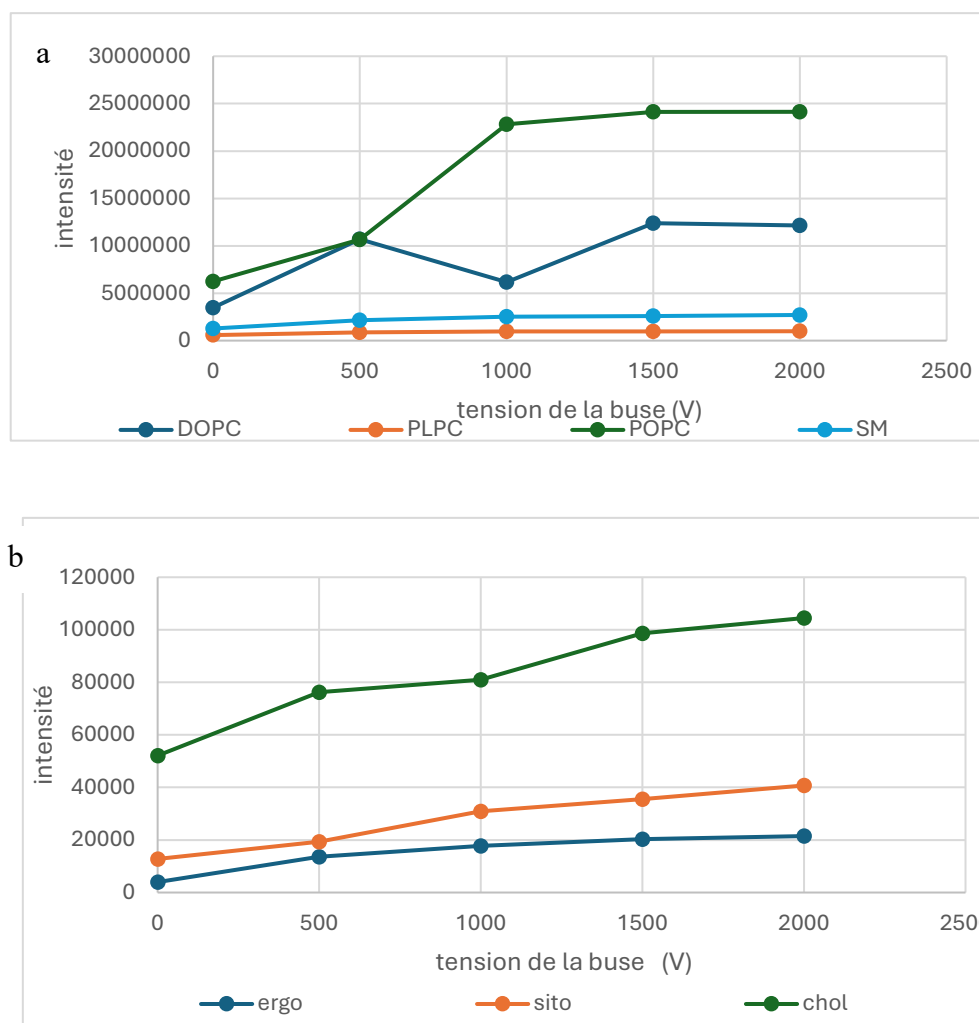


Figure 21 Optimisation de la tension de la buse a. Pour le DOPC, POPC, PLPC, SM b. pour l'ergostérol, le β -sitostérol et le cholestérol

Une tension de 2000V pour la buse a été retenue comme optimum pour l'ensemble des composés étudiés. Cette valeur correspond soit à un plateau pour la sphingomyéline et les PC ou au maximum pour les stérols. Ce paramètre contribue à la désolvatation des ions issus de l'ESI+ et à leur transfert vers l'analyseur (Figure 21).

5.4.7 Analyse multiple reaction monitoring

Suite à l'optimisation, une analyse en mode multiple reaction monitoring (MRM) a été effectuée (Figure 22, Figure 23, Figure 24).

L'analyse MRM permet de cibler uniquement l'ion précurseur et l'ion fragment ce qui permet d'éliminer l'effet matrice et les interférences causées par le bruit chimique ainsi que de gagner en sensibilité et en sélectivité.

Les graphes pour l'analyse MRM d'un stérol, un PC et la sphingomyéline seront présentés (Figure 22, Figure 23, Figure 24). Les autres composées étant en annexes 12 et 13.

Etant donné que le gradient a été modifié lors de l'analyse MRM, les temps de rétention l'ont également été (Tableau 10).

Ainsi, ce changement de gradient permet de raccourcir le temps d'analyse initialement de 15 minutes par échantillon à 11, 6 minutes. Entre le gradient utilisé pour l'optimisation et celui appliqué pour l'analyse MRM, une minute supplémentaire a été ajoutée afin d'éviter des variations de pression trop brutales. Le gradient a ainsi été rendu plus progressif, conduisant à une élution plus homogène et à des pics plus symétriques.

Tableau 10 Temps de rétention des ions fragments lors de l'analyse MRM après modification du gradient

Composés	Temps de rétention (min)
POPC	4,8
DOPC	4,8
PLPC	4,4
SM	4,7
Ergostérol	4,2
Cholestérol	3,8
B-sitostérol	4,2

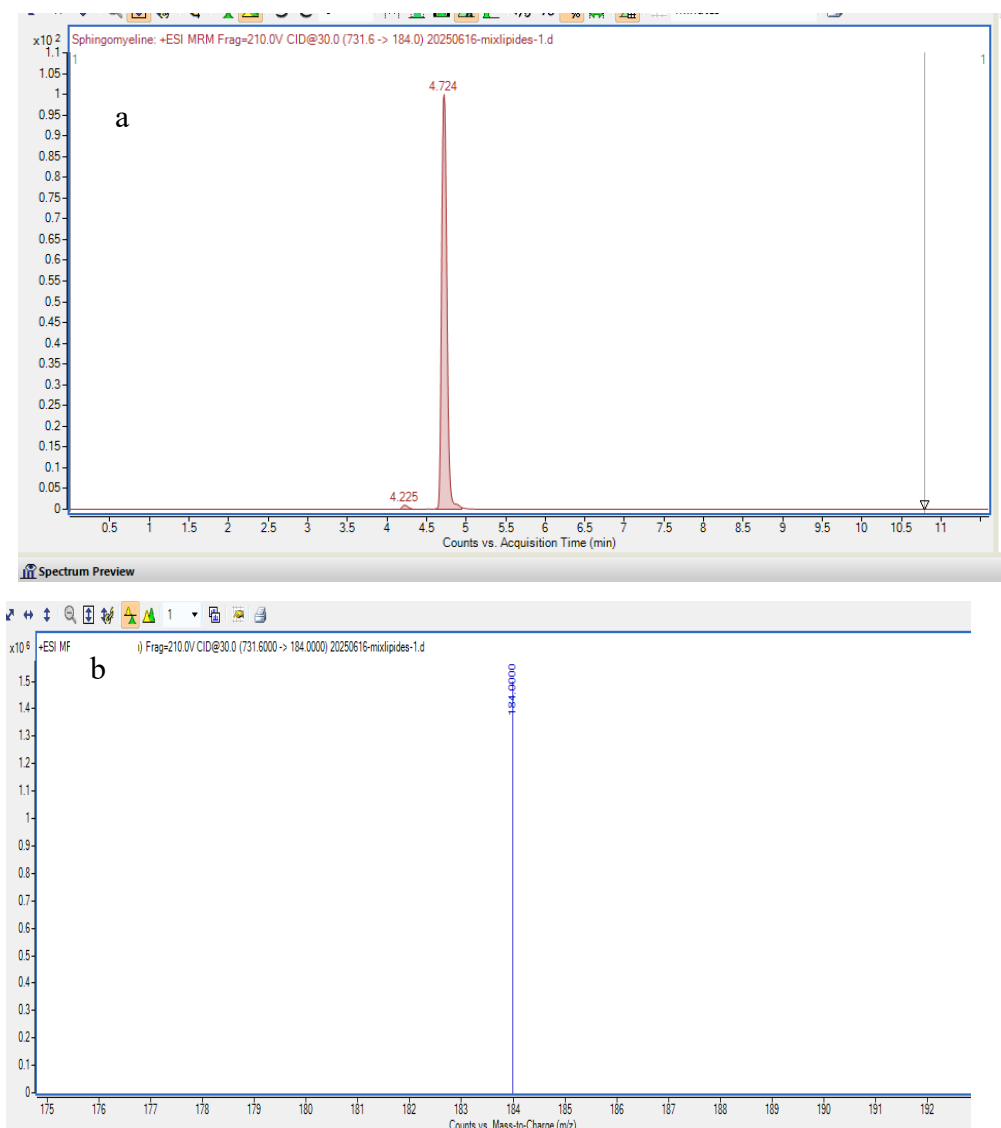
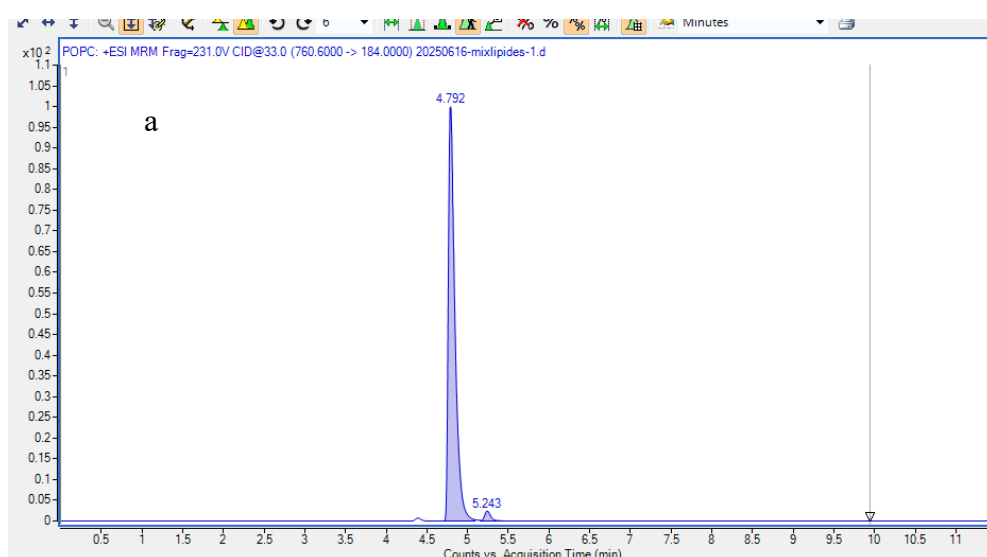


Figure 22. Analyse MRM a. sphingomyéline b. spectre de masse de la sphingomyéline



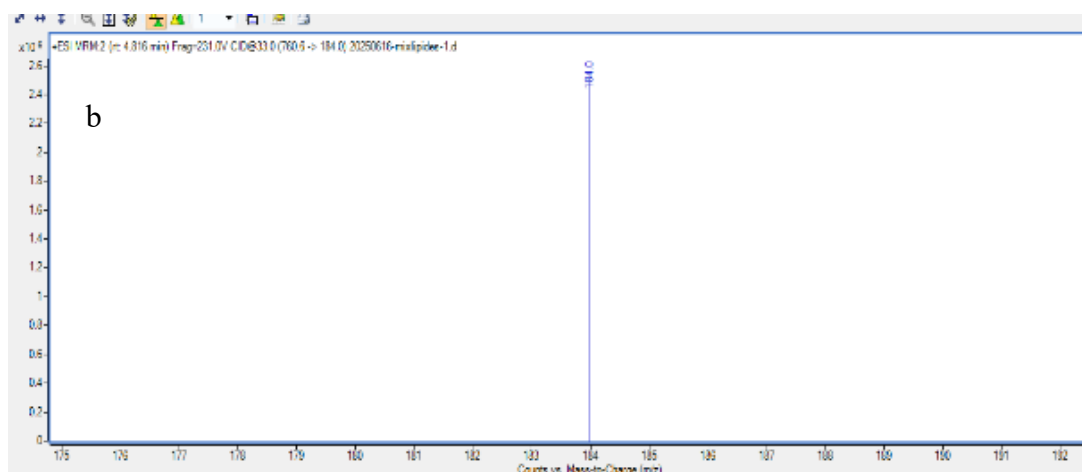
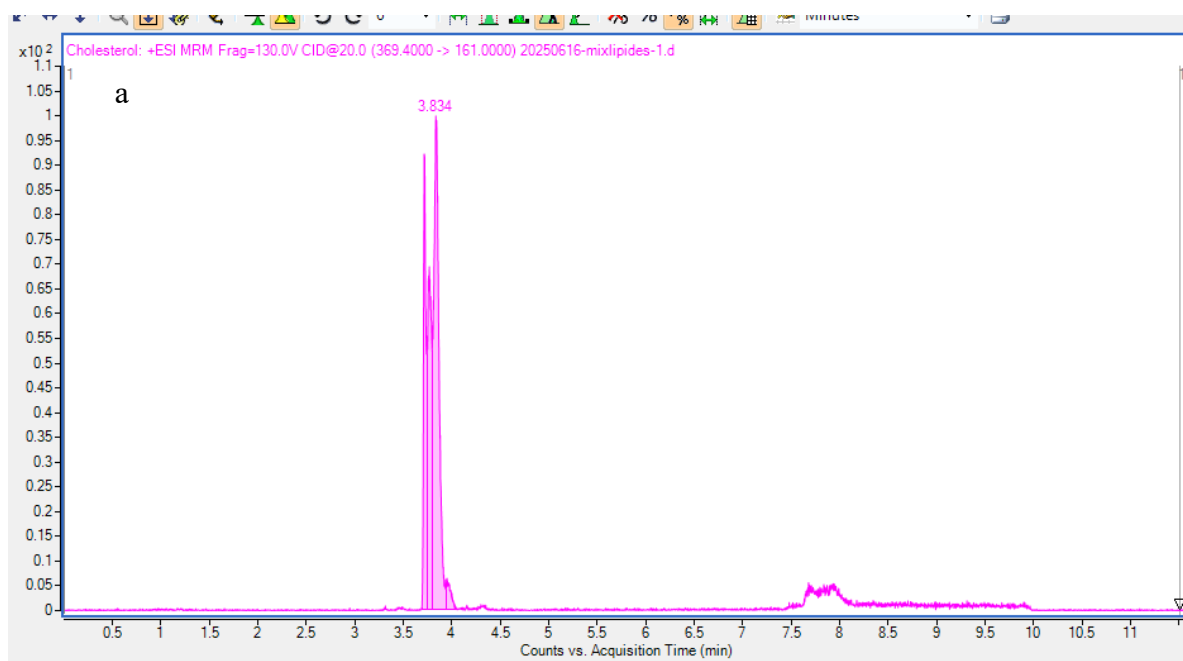


Figure 23 Analyse MRM a. du POPC b. spectre de masse du POPC

Les phosphatidylcholines et la sphingomyéline affichent des pics plus symétriques grâce à l'optimisation ainsi qu'à l'analyse MRM (Figure 22, Figure 23)



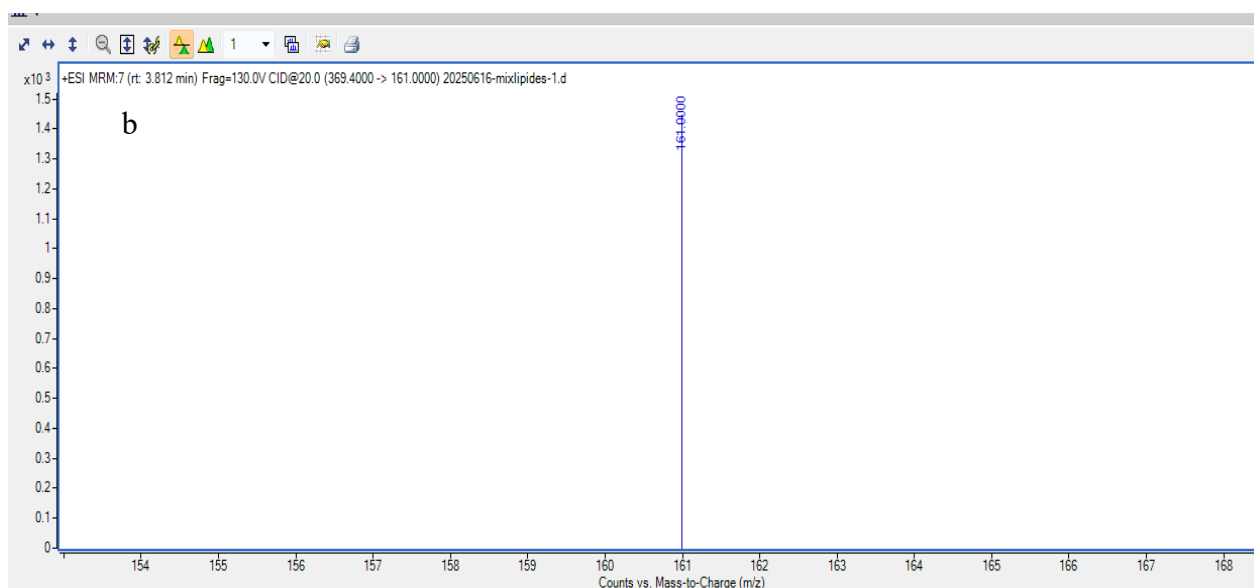


Figure 24. Analyse MRM a.cholestérol b. spectre de masse du cholestérol

L'analyse MRM met en évidence des profils complexes pour les stérols, avec plusieurs composés coéluant dans un seul signal chromatographique (Figure 24). Cela révèle la présence potentielle de stéréoisomères ou d'isomères de constitution présents dans le produit (Figure 24).

5.4.8 Analyse des échantillons récoltés dans la sous-phase de la balance à film

Les échantillons seront analysés ultérieurement.

5.5 Effet du β -sitostérol sur la fluidité membranaire

La fluidité membranaire a été analysée en mesurant le GP du Laurdan, une sonde solvatochromatique sensible à son environnement. En effet, le Laurdan incorporé dans la membrane biomimétique détecte l'état d'hydratation local grâce à son moment dipolaire. Lorsqu'il est excité, le dipôle du Laurdan interagit avec l'environnement immédiat⁸⁷.

Si l'environnement est plus hydraté, les molécules d'eau se réorganisent autour de la sonde. Cette réorganisation stabilise l'état excité du Laurdan par relaxation dipolaire, entraînant une perte d'énergie avant l'émission de fluorescence. Cela se traduit par une émission décalée vers de plus grande longueur d'onde, ici autour de 480 nm⁸⁷.

A l'inverse, dans un environnement moins hydraté, cette stabilisation est moindre, la perte d'énergie est réduite, et l'émission de fluorescence est plus importante à une longueur d'onde plus courte, environ 440 nm⁸⁷.

Des modèles biomimétiques sous forme de liposomes composés de POPC/SM/chol 1:1:1 et 20:20:60 ont été utilisés. Pour chaque système, le cholestérol a été substitué par 5 ou 50 % de β -sitostérol.

La Figure 25 compare les GP pour les différents systèmes lipidiques étudiés.

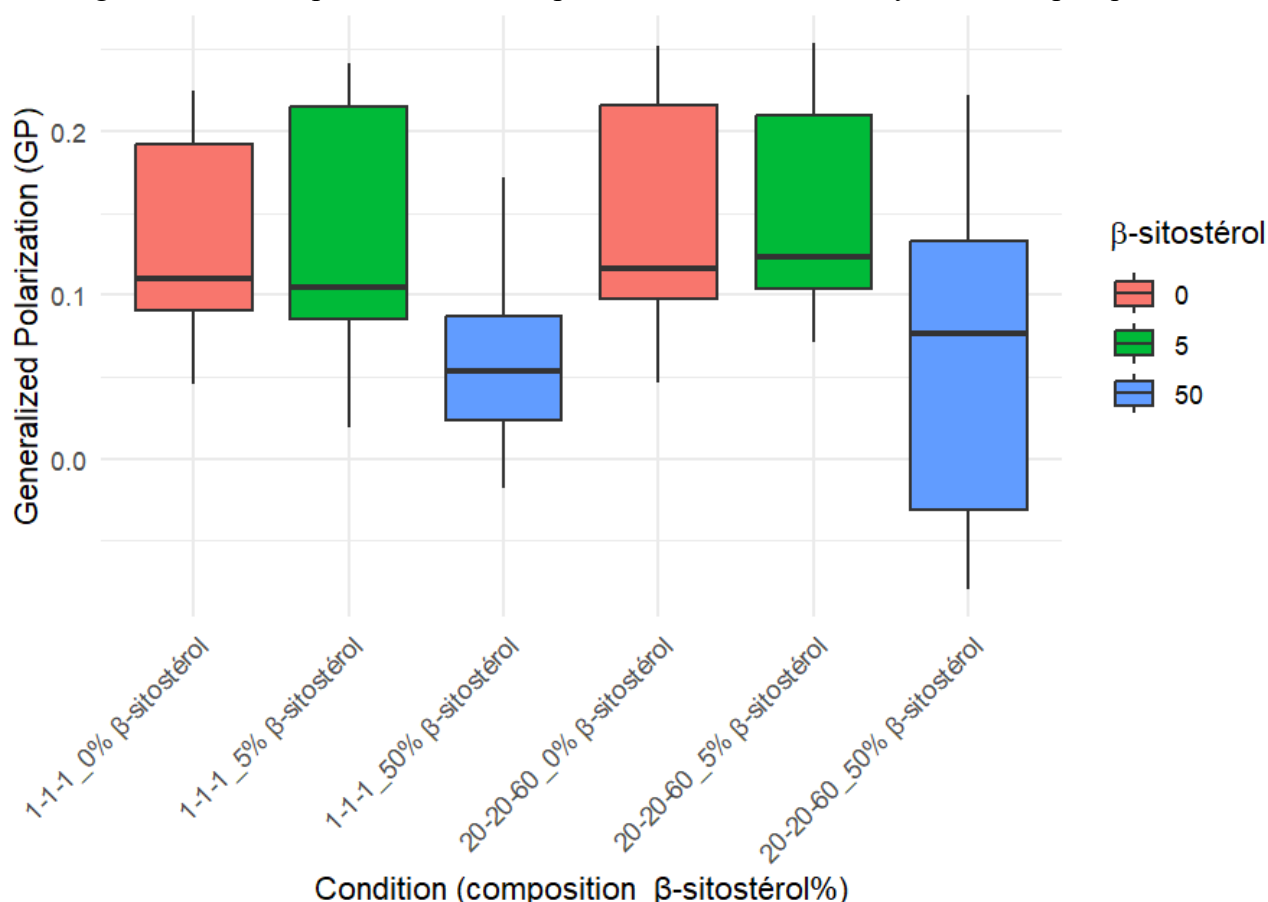


Figure 25. Polarisation généralisée (GP) du Laurdan selon le pourcentage de substitution du cholestérol par le β-sitostérol pour les modèles 1 : 1 : 1 et 20 : 20 : 60 POPC/SM/chol

Pour tous les systèmes et quel que soit le taux de substitution du cholestérol par le β-sitostérol, les GP sont positifs selon la valeur médiane. Celles-ci sont présentées dans le Tableau 11 avec les valeurs minimales et maximales de chaque modèle testé. Les modèles possédant 50% de substitution par du β-sitostérol montrent des valeurs plus faibles de GP. Cependant bien que leur médiane soit positive, les modèles avec 50% de substitution du cholestérol par du β-sitostérol présentent certaines valeurs de GP négatives. Ceci signifie que la membrane biomimétique est dans un état plus désordonné⁸⁸. D'après la littérature⁶⁸, la membrane présente des domaines dans un état liquide ordonné (composé de sphingomyéline et de cholestérol) et d'autres dans un état liquide désordonné (composé principalement de POPC).

Tableau 11 . Médiane, valeur maximale et minimale de GP pour chaque modèle testé

Modèles	Médiane GP	Minimum GP	Maximum GP
1 : 1 : 1 0%	0,110	0,0456	0,225
1 : 1 : 1 5%	0,105	0,0190	0,242
1 : 1 : 1 50%	0,0534	-0,0181	0,172
20 : 20 : 60 0%	0,116	0,0461	0,252
20 : 20 : 60 5%	0,123	0,0712	0,254
20 : 20 : 60 50%	0,765	-0,0801	0,223

Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney , destiné à étudier l'effet du cholestérol sur les radeaux lipidiques, a montré qu'il existe une différence significative entre les deux modèles pour un même pourcentage

de substitution. Ces différences sont respectivement hautement significatives ($p\text{-adj}=0,00238$) entre les modèles 1:1:1 et 20:20:60 POPC/SM/chol lorsque le cholestérol n'est pas substitué, très hautement significative lors d'une substitution de 5% ($p\text{-adj}=0,0000835$) et significative lorsque la substitution est de 50% ($p\text{-adj}=0,0135$). Quelle que soit la proportion de β -sitostérol utilisée pour substituer le cholestérol, la composition 20:20:60 présente toujours une valeur de GP significativement plus élevée comparée à la composition 1:1:1 à proportion de substitution égale. Cela signifie que la composition lipidique influence la fluidité membranaire indépendamment du taux de β -sitostérol. La membrane est plus rigide pour les modèles 20:20:60 POPC/SM/chol que pour les modèles 1:1:1 POPC/SM/chol et ce quel que soit le taux de substitution du cholestérol par le β -sitostérol.

Ces résultats peuvent être mis en relation avec le diagramme de phase SM/POPC/chol qui montre que lorsque le taux de cholestérol augmente, celui-ci présente une phase liquide ordonnée⁴⁵. Ceci est en accord avec le travail de Centonze et al.⁹ montrant que le cholestérol augmente la rigidité des membranes de cellules cancéreuses, tout en augmentant l'épaisseur et diminuant la perméabilité

Cependant, il ne faut pas oublier que lorsque le taux de cholestérol augmente ceux de la sphingomyéline et du POPC diminuent. Or ceux-ci influencent aussi la fluidité membranaire. Le POPC a tendance à augmenter la fluidité membranaire. Quant à la sphingomyéline présente au sein des radeaux lipidiques, elle a tendance à former des domaines ordonnés en interagissant avec le cholestérol grâce aux forces de Van der Waals favorables établies entre le système d'anneaux rigides du cholestérol et les chaînes hydrophobes de la sphingomyéline⁸⁹.

Pour comparer l'effet du pourcentage de substitution du cholestérol par le β -sitostérol, la réalisation d'un test de Kruskal-Wallis a été effectué sur les deux modèles 20:20:60 et 1:1:1 POPC/SM/chol. Il a montré que des différences très hautement significatives selon le pourcentage de substitution par le β -sitostérol (respectivement $p\text{-adj}=1,26 \times 10^{-31}$ pour 20:20:60 et $p\text{-adj}=1,54 \times 10^{-52}$ pour 1:1:1) existent. Ceci signifie que le pourcentage de β -sitostérol a une influence significative sur les valeurs de GP au sein de chacun des modèles.

Sur base des résultats du test de Kruskal-Wallis, un test de post-hoc de Wilcoxon avec correction de Bonferroni a pu être appliqué. Celui-ci a révélé qu'il n'existe pas de différence significative, que ce soit pour le modèle 20:20:60 ou le modèle 1:1:1 entre le modèle sans substitution du cholestérol par du β -sitostérol et le modèle comportant une substitution de 5% ($p\text{-adj}$ de 1 pour les deux modèles).

Cependant, il existe une différence très hautement significative entre les modèles sans substitution ou avec 5% de substitution de cholestérol par le β -sitostérol et les modèles avec un remplacement de 50% du cholestérol par du β -sitostérol (respectivement $p\text{-adj}=2,33 \times 10^{-46}$ et $p\text{-adj}=1,46 \times 10^{-34}$ pour le modèle 1:1:1 et $p\text{-adj}=1,23 \times 10^{-24}$ et $p\text{-adj}=2,47 \times 10^{-24}$ pour le modèle 20:20:60). Les modèles possédant 50% de substitution par du β -sitostérol sont significativement différents des modèles avec 0 et 5% de substitution avec une même composition. Ils présentent des valeurs plus faibles de GP ce qui traduit une membrane plus hydratée ainsi qu'une plus grande fluidité membranaire^{87,90}.

Cependant, pour une même composition, le fait qu'il n'y ait pas de différence significative entre une absence de substitution et une substitution de 5% du cholestérol par du β -sitostérol traduit le fait qu'une substitution minimale du cholestérol par du β -sitostérol est nécessaire pour observer un effet significatif sur la fluidité membranaire détectable par la sonde Laurdan.

L'augmentation de la fluidité membranaire observée en présence d'une substitution de 50% du cholestérol par du β -sitostérol s'explique par la différence de structure entre les deux stérols. Le β -sitostérol possède un groupement éthyle en position C24 sur la chaîne latérale, absent chez le

cholestérol². Cette différence perturbe l'organisation des lipides au sein de la bicouche, entraînant une compaction réduite et donc une membrane plus fluide. Cette augmentation de fluidité propre dans ce cas-ci aux membranes substituées par 50% de β -sitostérol à la place du cholestérol, facilite une meilleure pénétration du tampon aqueux, ce qui entraîne une hydratation plus importante de la région interfaciale. A l'inverse, le cholestérol, de par sa structure plus compacte, renforce l'ordre lipidique et limite l'accessibilité de l'eau dans sa membrane^{9,87}.

En présence de β -sitostérol, l'eau disponible peut se réorganiser autour de la sonde, stabilisant son état excité par relaxation dipolaire. Cela provoque une perte partielle d'énergie avant l'émission et se traduit par une fluorescence à plus grande longueur d'onde. A contrario, dans les membranes riches en cholestérol, c'est-à-dire moins hydratées, cette stabilisation est réduite, et la sonde émet à une longueur d'onde plus courte. Cette différence explique donc que la GP soit significativement plus faible en présence d'une substitution de 50% du cholestérol par du β -sitostérol. Cela confirme son effet fluidifiant et hydratant par rapport au cholestérol^{9,87}.

Ce résultat est en accord avec l'étude de Jovanović et al., 2018 qui ont utilisé la polarisation de fluorescence mesurée à l'aide de la sonde BODIPY 581/591 C11 pour évaluer la fluidité membranaire. Leur étude a montré que, à température égale et à pourcentage molaire équivalent, le mélange binaire POPC:sito possède une polarisation de fluorescence plus importante et donc une fluidité plus importante que le mélange POPC:chol⁵⁵.

6. Conclusion et perspectives

Ce travail de fin d'études a permis de mieux cerner l'influence du β -sitostérol au sein de membranes biomimétiques de cellules saines et cancéreuses, en s'appuyant sur différentes approches biophysiques et analytiques.

Les résultats obtenus montrent que, dans un environnement à pH 7,4 (10 mM Tris-HCl et 150 mM NaCl) et sur des modèles biomimétiques de membrane plasmique contenant des radeaux lipidiques, une substitution du cholestérol par le β -sitostérol peut induire une augmentation de la fluidité membranaire et une expansion de la monocouche via des forces répulsives tout en étant thermodynamiquement stable. Cependant, lorsque la concentration de β -sitostérol est inférieure à un certain seuil, aucun effet voire des effets inverses peuvent être observés, avec par exemple une condensation accrue ou une absence de différence significative au niveau de la rigidité membranaire.

Le recours à des modèles biomimétiques a permis d'isoler et d'analyser spécifiquement les interactions lipidiques, en évitant la complexité inhérente aux systèmes cellulaires.

La transposition de ces observations à des membranes réelles, notamment celles des cellules cancéreuses riches en cholestérol, pourrait offrir des perspectives thérapeutiques intéressantes. En effet, remplacer partiellement le cholestérol par le β -sitostérol pourrait atténuer la rigidification membranaire et déstabiliser les rafts lipidiques. Cela permettrait d'affaiblir les voies de signalisation pro-survie, tout en facilitant le recrutement des récepteurs apoptotiques et le renforcement de la signalisation pro-apoptotique²⁻⁴. De plus, cela pourrait également permettre une meilleure pénétration des médicaments dans la cellule⁹. Toutefois, la faible absorption intestinale du β -sitostérol soulève la question de la faisabilité via l'alimentation seule².

Cependant, de nombreuses expériences doivent encore être menées sur les modèles biomimétiques pour approfondir nos connaissances à l'échelle moléculaire de l'effet du β -sitostérol sur l'organisation de membranes cellulaires :

- l'utilisation du microscope à angle de Brewster pour visualiser directement la formation de domaines lipidiques lors du remplacement du cholestérol par le β -sitostérol dans la cuve de Langmuir³⁵.

- l'analyse des échantillons récoltés lors de l'expérience de balance à film en adsorption pour constater ou non le relargage de lipides en sous-phase.

- l'étude des modèles binaires avec un plus grand nombre de combinaisons de lipides possibles afin de caractériser les interactions entre paires de lipides et affiner la compréhension des systèmes plus complexes.

- Pour la balance à film en compression, l'exploration de compositions membranaires enrichies en cholestérol (modèle 20:20:60 POPC/SM/chol) pour reproduire plus fidèlement les membranes cancéreuses et analyser les effets d'un remplacement progressif par le β -sitostérol.

- Pour l'expérience de fluidité membranaire et des propriétés interfaciales sur les monocouches lipidiques, il serait intéressant de varier la gamme de pourcentage de substitution par le β -sitostérol

pour les modèles quaternaires pour déterminer le seuil critique à partir duquel un effet fluidisant significatif et une expansion significative sont observés ⁷⁰.

En conclusion, ce travail met en évidence un effet seuil du sitostérol au-delà duquel les propriétés membranaires basculent d'un état condensé et rigide vers un état plus fluide et expansé. Ces résultats ouvrent la voie à de nombreuses perspectives et pistes de recherches sur la modulation contrôlée des propriétés membranaires et sur le potentiel du β -sitostérol comme adjuvant dans certaines stratégies anticancéreuses.

7. Bibliographie

- (1) Li, B.; Qin, Y.; Yu, X.; Xu, X.; Yu, W. Lipid Raft Involvement in Signal Transduction in Cancer Cell Survival, Cell Death and Metastasis. *Cell Proliferation* **2022**, 55 (1), e13167. <https://doi.org/10.1111/cpr.13167>.
- (2) Wang, H.; Wang, Z.; Zhang, Z.; Liu, J.; Hong, L. β -Sitosterol as a Promising Anticancer Agent for Chemoprevention and Chemotherapy: Mechanisms of Action and Future Prospects. *Advances in Nutrition* **2023**, 14(5):1085-1110. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2023.05.013>
- (3) Hąc-Wydro, K. Langmuir Monolayers Studies on the Relationship between the Content of Cholesterol in Model Erythrocyte Membranes and the Influence of β -Sitosterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 91, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.11.009>.
- (4) Awad, A. B.; Chinnam, M.; Fink, C. S.; Bradford, P. G. β -Sitosterol Activates Fas Signaling in Human Breast Cancer Cells. *Phytomedicine* **2007**, 14 (11), 747–754. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.01.003>.
- (5) Butler, L.; Perone, Y.; Dehairs, J.; Lupien, L. E.; Laat, V. de; Talebi, A.; Loda, M.; Kinlaw, W. B.; Swinnen, J. V. Lipids and Cancer: Emerging Roles in Pathogenesis, Diagnosis and Therapeutic Intervention. *Advanced drug delivery reviews* **2020**, 159, 245. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.013>.
- (6) *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3322/caac.21834> (accessed 2025-07-21).
- (7) Fu, Y.; Zou, T.; Shen, X.; Nelson, P. J.; Li, J.; Wu, C.; Yang, J.; Zheng, Y.; Bruns, C.; Zhao, Y.; Qin, L.; Dong, Q. Lipid Metabolism in Cancer Progression and Therapeutic Strategies. *MedComm* **2020**, 2 (1), 27. <https://doi.org/10.1002/mco2.27>.
- (8) Vona, R.; Iessi, E.; Matarrese, P. Role of Cholesterol and Lipid Rafts in Cancer Signaling: A Promising Therapeutic Opportunity? *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.622908>.
- (9) Centonze, G.; Natalini, D.; Piccolantonio, A.; Salemme, V.; Morellato, A.; Arina, P.; Riganti, C.; Defilippi, P. Cholesterol and Its Derivatives: Multifaceted Players in Breast Cancer Progression. *Frontiers in Oncology* **2022**, 12, 906670. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.906670>.
- (10) Zhang, S. Zhu N. ; Li H.F. ; Gu J. ; Zhang ; C.J., Liao D.F. ; Qin L. The lipid rafts in cancer stem cell: A Target to Eradicate Cancer. *Stem Cell Research and Therapy* **2022**, 13(1):432. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03111-8>
- (11) Cockcroft, S. Mammalian Lipids: Structure, Synthesis and Function. *Essays Biochem* **2021**, 65 (5), 813–845. <https://doi.org/10.1042/EBC20200067>.
- (12) Spector, A. A.; Yorek, M. A. Membrane Lipid Composition and Cellular Function. *Journal of Lipid Research* **1985**, 26 (9), 1015–1035. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34276-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34276-0).
- (13) Pankov, R.; Markovska, T.; Antonov, P.; Ivanova, L.; Momchilova, A. The Plasma Membrane Lipid Composition Affects Fusion between Cells and Model Membranes. *Chem Biol Interact* **2006**, 164 (3), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.09.010>.
- (14) Sezgin, E.; Levental, I.; Mayor, S.; Eggeling, C. The Mystery of Membrane Organization: Composition, Regulation and Roles of Lipid Rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017**, 18 (6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- (15) Pike, L. J. Rafts Defined: A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research* **2006**, 47 (7), 1597–1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>.
- (16) Maja, M.; Tyteca, D. Alteration of Cholesterol Distribution at the Plasma Membrane of Cancer Cells: From Evidence to Pathophysiological Implication and Promising Therapy Strategy. *Front Physiol* **2022**, 13, 999883. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.999883>.

- (17) Woyengo, T. A.; Ramprasath, V. R.; Jones, P. J. H. Anticancer Effects of Phytosterols. *Eur J Clin Nutr* **2009**, 63 (7), 813–820. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.29>.
- (18) Brown, J. S.; Amend, S. R.; Austin, R. H.; Gatenby, R. A.; Hammarlund, E. U.; Pienta, K. J. Updating the Definition of Cancer. *Mol Cancer Res* **2023**, 21 (11), 1142–1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>.
- (19) Lemaire, J.; Larrue, R.; Perrais, M.; Cauffiez, C.; Pottier, N. Aspects Fondamentaux Du Développement Tumoral. *Bulletin du Cancer* **2020**, 107 (11), 1148–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.08.004>.
- (20) Castaneda, M.; den Hollander, P.; Kuburich, N. A.; Rosen, J. M.; Mani, S. A. Mechanisms of Cancer Metastasis. *Semin Cancer Biol* **2022**, 87, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.10.006>.
- (21) Szlasa, W.; Zendran, I.; Zalesińska, A.; Tarek, M.; Kulbacka, J. Lipid Composition of the Cancer Cell Membrane. *J Bioenerg Biomembr* **2020**, 52 (5), 321–342. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09846-4>.
- (22) Cargnello, M.; Roux, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2011**, 75(1):50-83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- (23) Dhanasekaran, D. N.; Reddy, E. P. JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene* **2008**, 27 (48), 6245–6251. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.301>.
- (24) *Molecular mapping and functional validation of GLP-1R cholesterol binding sites in pancreatic beta cells*. <https://elifesciences.org/reviewed-preprints/101011> (accessed 2025-05-03).
- (25) *A protein tunnel that shuttles lipids around the cell*. <https://www.nature.com/articles/d41586-025-01167-z> (accessed 2025-08-09).
- (26) Zalba, S.; Ten Hagen, T. L. M. Cell Membrane Modulation as Adjuvant in Cancer Therapy. *Cancer Treat Rev* **2017**, 52, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008>.
- (27) Saeidnia, S. The Story of Beta-Sitosterol- A Review. *AJEA* **2014**, 4 (5), 590–609. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2014/7764>.
- (28) Ovesná, Z.; Vachálková, A.; Horváthová, K. Taraxasterol and Beta-Sitosterol: New Naturally Compounds with Chemoprotective/Chemopreventive Effects. *Neoplasma* **2004**, 51 (6), 407–414.
- (29) Lee, S. R.; Yun, D. C.; Lee, S. H.; Yang, S. Y.; Kim, I. S. Determination of Phytosterols in Oryza Sativa L. Cultivars by Liquid Chromatography Atmospheric Chemical Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer (LC-APCI-TOF-MS) Coupled with a Modified QuEChERS Method. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* **2012**, 1 (1), 15–19. <https://doi.org/10.4236/jacen.2012.11003>.
- (30) Gallová, J.; Uhríková, D.; Kučerka, N.; Doktorovová, S.; Funari, S. S.; Teixeira, J.; Balgavý, P. The Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Structure of Saturated Diacylphosphatidylcholine Bilayers. *European Biophysics Journal* **2010**, 40 (2), 153–163. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0635-6>.
- (31) Nandi, S.; Nag, A.; Khatua, S.; Sen, S.; Chakraborty, N.; Naskar, A.; Acharya, K.; Calina, D.; Sharifi-Rad, J. Anticancer Activity and Other Biomedical Properties of β -Sitosterol: Bridging Phytochemistry and Current Pharmacological Evidence for Future Translational Approaches. *Phytotherapy Research* **2024**, 38 (2), 592–619. <https://doi.org/10.1002/ptr.8061>.
- (32) Awad, A. B.; Chen, Y. C.; Fink, C. S.; Hennessey, T. Beta-Sitosterol Inhibits HT-29 Human Colon Cancer Cell Growth and Alters Membrane Lipids. *Anticancer Res* **1996**, 16 (5A), 2797–2804.
- (33) von Holtz, R. L.; Fink, C. S.; Awad, A. B. Beta-Sitosterol Activates the Sphingomyelin Cycle and Induces Apoptosis in LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *Nutr Cancer* **1998**, 32 (1), 8–12. <https://doi.org/10.1080/01635589809514709>.
- (34) Morad, S. A. F.; Cabot, M. C. Ceramide-Orchestrated Signalling in Cancer Cells. *Nat Rev Cancer* **2013**, 13 (1), 51–65. <https://doi.org/10.1038/nrc3398>.
- (35) Hąc-Wydro, K. Studies on β -Sitosterol and Ceramide-Induced Alterations in the Properties of Cholesterol/Sphingomyelin/Ganglioside Monolayers. *Biochim Biophys Acta* **2013**, 1828 (11), 2460–2469. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.030>.

- (36) Saddoughi, S. A.; Ogretmen, B. Diverse Functions of Ceramide in Cancer Cell Death and Proliferation. *Adv Cancer Res* **2013**, *117*, 37–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394274-6.00002-9>.
- (37) Awad, A. B.; Chinnam, M.; Fink, C. S.; Bradford, P. G. Beta-Sitosterol Activates Fas Signaling in Human Breast Cancer Cells. *Phytomedicine* **2007**, *14* (11), 747–754. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.01.003>.
- (38) Awad, A. B.; Fink, C. S.; Trautwein, E. A.; Ntanos, F. Y. β -Sitosterol Stimulates Ceramide Metabolism in Differentiated Caco2 Cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2005**, *16* (11), 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.04.004>.
- (39) Deleu, M.; Crowet, J.-M.; Nasir, M. N.; Lins, L. Complementary Biophysical Tools to Investigate Lipid Specificity in the Interaction between Bioactive Molecules and the Plasma Membrane: A Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838* (12), 3171–3190. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.023>.
- (40) Brezesinski, G.; Möhwald, H. Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **2003**, *100–102*, 563–584. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00071-4).
- (41) Mozafari, M. R. Liposomes: An Overview of Manufacturing Techniques. *Cell Mol Biol Lett* **2005**, *10* (4), 711–719.
- (42) Edwards, K. A.; Baeumner, A. J. Liposomes in Analyses. *Talanta* **2006**, *68* (5), 1421–1431. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.044>.
- (43) Tresset, G. The Multiple Faces of Self-Assembled Lipidic Systems. *PMC Biophysics* **2009**, *2* (1), 3. <https://doi.org/10.1186/1757-5036-2-3>.
- (44) Lecordier, L.; Uzureau, S.; Vanwalleghe, G.; Deleu, M.; Crowet, J.-M.; Barry, P.; Moran, B.; Voorheis, P.; Dumitru, A.-C.; Yamaro-Botté, Y.; Dieu, M.; Tebabi, P.; Vanhollebeke, B.; Lins, L.; Botté, C. Y.; Alsteens, D.; Dufrêne, Y.; Pérez-Morga, D.; Nolan, D. P.; Pays, E. The Trypanosoma Brucei KIFC1 Kinesin Ensures the Fast Antibody Clearance Required for Parasite Infectivity. *iScience* **2020**, *23* (9), 101476. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101476>.
- (45) de Almeida, R. F. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts. *Biophys J* **2003**, *85* (4), 2406–2416. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74664-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74664-5).
- (46) Bacia, K.; Schwille, P.; Kurzchalia, T. Sterol Structure Determines the Separation of Phases and the Curvature of the Liquid-Ordered Phase in Model membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2005**, *102*(9):3272–3277. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408215102>
- (47) Wolff, J. Ternary Mixtures of Lipids and Cholesterol : A Theoretical Model. phdthesis, Université de Strasbourg, 2013. <https://theses.hal.science/tel-01068363> (accessed 2025-04-30).
- (48) Calori, I. R.; Pazin, W. M.; Brunaldi, K.; Pellosi, D. S.; Caetano, W.; Tedesco, A. C.; Hioka, N. Laurdan as Fluorescent Probe to Determinate the Critical Micelle Temperature of Polymers from Pluronic®-Coated Fluid Phase Liposomes. *Journal of Molecular Liquids* **2019**, *294*, 111562. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111562>.
- (49) Carravilla, P.; Nieva, J. L.; Goñi, F. M.; Requejo-Isidro, J.; Huarte, N. Two-Photon Laurdan Studies of the Ternary Lipid Mixture DOPC:SM:Cholesterol Reveal a Single Liquid Phase at Sphingomyelin:Cholesterol Ratios Lower Than 1. *Langmuir* **2015**, *31* (9), 2808–2817. <https://doi.org/10.1021/la504251u>.
- (50) Hąc-Wydro, K.; Wydro, P.; Dynarowicz-Łątka, P.; Paluch, M. Cholesterol and Phytosterols Effect on Sphingomyelin/Phosphatidylcholine Model Membranes—Thermodynamic Analysis of the Interactions in Ternary Monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, *329* (2), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.09.057>.
- (51) Hąc-Wydro, K.; Dynarowicz-Łątka, P. The Impact of Sterol Structure on the Interactions with Sphingomyelin in Mixed Langmuir Monolayers. *J Phys Chem B* **2008**, *112* (36), 11324–11332. <https://doi.org/10.1021/jp803193s>.

- (52) Hac-Wydro, K.; Wydro, P.; Jagoda, A.; Kapusta, J. The Study on the Interaction between Phytosterols and Phospholipids in Model Membranes. *Chem Phys Lipids* **2007**, *150* (1), 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.06.211>.
- (53) Hac-Wydro, K. The Replacement of Cholesterol by Phytosterols and the Increase of Total Sterol Content in Model Erythrocyte Membranes. *Chem Phys Lipids* **2010**, *163* (7), 689–697. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.07.001>.
- (54) Hellgren, L. I.; Sandelius, A. S. The Impact of Different Phytosterols on the Molecular Dynamics in the Hydrophobic/Hydrophilic Interface Phosphatidylcholine–Liposomes. *Physiologia Plantarum* **2001**, *113* (1), 23–32. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130104.x>.
- (55) *Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics - Jovanović - 2018 - European Journal of Lipid Science and Technology - Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejlt.201800039> (accessed 2025-07-23).
- (56) Marsh, D. Lateral Pressure in Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1996**, *1286* (3), 183–223. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3).
- (57) Cajka, T.; Fiehn, O. Increasing Lipidomic Coverage by Selecting Optimal Mobile-Phase Modifiers in LC–MS of Blood Plasma. *Metabolomics* **2016**, *12* (2), 34. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0929-x>.
- (58) Ma, W.; Chen, H.; Hou, H.; Hu, Q.; Bai, Y. TiO₂@COF-Based Solid-Phase Microextraction Combined with UHPLC-MS/MS for the Rapid Determination of Potential Biomarkers of Phosphatidylcholines and Lysophosphatidylcholines in Head and Neck Cancers. *Anal Bioanal Chem* **2023**, *415* (27), 6771–6783. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04954-7>.
- (59) Abdel Ghani, A. E.; Al-Saleem, M. S. M.; Abdel-Mageed, W. M.; AbouZeid, E. M.; Mahmoud, M. Y.; Abdallah, R. H. UPLC-ESI-MS/MS Profiling and Cytotoxic, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antidiabetic, and Antiobesity Activities of the Non-Polar Fractions of *Salvia Hispanica* L. Aerial Parts. *Plants* **2023**, *12* (5), 1062. <https://doi.org/10.3390/plants12051062>.
- (60) Xu, Y.; Li, H.; Han, Y.; Wang, T.; Wang, Y.; Gong, J.; Gao, K.; Chen, W.; Li, W.; Zhang, H.; Wang, J.; Qiu, X.; Zhu, T. A Simple and Rapid Method for Extraction and Measurement of Circulating Sphingolipids Using LC–MS/MS: A Targeted Lipidomic Analysis. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414* (6), 2041–2054. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03853-z>.
- (61) Basit, A.; Piomelli, D.; Armirotti, A. Rapid Evaluation of 25 Key Sphingolipids and Phosphosphingolipids in Human Plasma by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (17), 5189–5198. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8585-6>.
- (62) Yin, S.; Su, M.; Xie, G.; Li, X.; Wei, R.; Liu, C.; Lan, K.; Jia, W. Factors Affecting Separation and Detection of Bile Acids by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry in Negative Mode. *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409* (23), 5533–5545. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0489-1>.
- (63) Lin, J.; Yang, X.; Wang, A.; Yang, J.; Zheng, Y.; Dong, H.; Tian, Y.; Zhang, Z.; Wang, M.; Song, R. LC-MS/MS Profiling of Colon Oxysterols and Cholesterol Precursors in Mouse Model of Ulcerative Colitis. *Journal of Chromatography A* **2024**, *1722*, 464865. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464865>.
- (64) Lopez, C.; Cheng, K.; Perez, J. Thermotropic Phase Behavior of Milk Sphingomyelin and Role of Cholesterol in the Formation of the Liquid Ordered Phase Examined Using SR-XRD and DSC. *Chemistry and Physics of Lipids* **2018**, *215*, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.07.008>.
- (65) *Phase Transitions in Coarse-Grained Lipid Bilayers Containing Cholesterol by Molecular Dynamics Simulations - PMC*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3512041/> (accessed 2025-08-13).
- (66) Chong, P. L.; Choate, D. Calorimetric Studies of the Effects of Cholesterol on the Phase Transition of C(18):C(10) Phosphatidylcholine. *Biophys J* **1989**, *55* (3), 551–556. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(89\)82848-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(89)82848-6).
- (67) *The effects of cholesterol and β -sitosterol on the structure of saturated diacylphosphatidylcholine bilayers | European Biophysics Journal*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00249-010-0635-6> (accessed 2025-08-13).

- (68) Petruzielo, R. S.; Heberle, F. A.; Drazba, P.; Katsaras, J.; Feigenson, G. W. Phase Behavior and Domain Size in Sphingomyelin-Containing Lipid Bilayers. *Biochim Biophys Acta* **2013**, 1828 (4), 1302–1313. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.01.007>.
- (69) (PDF) *Thermodynamic and Structural Properties of Biomimetic Monolayers Containing Cholesterol and Magnetite Nanoparticles*. https://www.researchgate.net/publication/391204098_Thermodynamic_and_Structural_Properties_of_Biomimetic_Monolayers_Containing_Cholesterol_and_Magnetite_Nanoparticles (accessed 2025-07-27).
- (70) Jurak, M.; Szafran, K.; Cea, P.; Martín, S. Analysis of Molecular Interactions between Components in Phospholipid-Immunosuppressant-Antioxidant Mixed Langmuir Films. *Langmuir* **2021**, 37 (18), 5601–5616. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00434>.
- (71) Lee, K. Y. C. Collapse Mechanisms of Langmuir Monolayers. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, 59 (1), 771–791. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104619>.
- (72) Pandit, S. A.; Chiu, S.-W.; Jakobsson, E.; Grama, A.; Scott, H. L. Cholesterol Packing around Lipids with Saturated and Unsaturated Chains: A Simulation Study. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, 24 (13), 6858. <https://doi.org/10.1021/la8004135>.
- (73) Ho, C. S.; Lam, C. W. K.; Chan, M. H. M.; Cheung, R. C. K.; Law, L. K.; Lit, L. C. W.; Ng, K. F.; Suen, M. W. M.; Tai, H. L. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev* **2003**, 24 (1), 3–12.
- (74) Liko, I.; Hopper, J. T. S.; Allison, T. M.; Benesch, J. L. P.; Robinson, C. V. Negative Ions Enhance Survival of Membrane Protein Complexes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2016**, 27, 1099. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1381-5>.
- (75) Gonzalez-Riano, C.; Gradillas, A.; Barbas, C. Exploiting the Formation of Adducts in Mobile Phases with Ammonium Fluoride for the Enhancement of Annotation in Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Based Lipidomics. *Journal of Chromatography Open* **2021**, 1, 100018. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2021.100018>.
- (76) Liebisch, G.; Binder, M.; Schifferer, R.; Langmann, T.; Schulz, B.; Schmitz, G. High Throughput Quantification of Cholesterol and Cholesteryl Ester by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochim Biophys Acta* **2006**, 1761 (1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.12.007>.
- (77) Rossmann, B.; Thurner, K.; Luf, W. MS–MS Fragmentation Patterns of Cholesterol Oxidation Products. *Monatsh. Chem.* **2007**, 138 (5), 437–444. <https://doi.org/10.1007/s00706-007-0589-2>.
- (78) Mo, S.; Dong, L.; Hurst, W. J.; Breemen, R. B. van. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Lipids* **2013**, 48 (9), 949. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3813-3>.
- (79) Chao, H.-C.; Chen, G.-Y.; Hsu, L.-C.; Liao, H.-W.; Yang, S.-Y.; Wang, S.-Y.; Li, Y.-L.; Tang, S.-C.; Tseng, Y. J.; Kuo, C.-H. Using Precursor Ion Scan of 184 with Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry for Concentration Normalization in Cellular Lipidomic Studies. *Analytica Chimica Acta* **2017**, 971, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.033>.
- (80) Shui, G.; Cheong, W. F.; Jappar, I. A.; Hoi, A.; Xue, Y.; Fernandis, A. Z.; Tan, B. K.-H.; Wenk, M. R. Derivatization-Independent Cholesterol Analysis in Crude Lipid Extracts by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Applications to a Rabbit Model for Atherosclerosis. *J Chromatogr A* **2011**, 1218 (28), 4357–4365. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.011>.
- (81) Jiang, K.; Gachumi, G.; Poudel, A.; Shurmer, B.; Bashir, Z.; El-Aneed, A. The Establishment of Tandem Mass Spectrometric Fingerprints of Phytosterols and Tocopherols and the Development of Targeted Profiling Strategies in Vegetable Oils. *J Am Soc Mass Spectrom* **2019**, 30 (9), 1700–1712. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02242-2>.
- (82) Mörlein, S.; Schuster, C.; Paal, M.; Vogeser, M. Collision Energy-Breakdown Curves – An Additional Tool to Characterize MS/MS Methods. *Clinical Mass Spectrometry* **2020**, 18, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2020.10.001>.

- (83) Sun, X.-D.; Zhang, M.; Wang, P.-J.; Chen, J.-H.; Zhao, M.; Cao, S.-Y.; Ji, J.-C.; Yuan, M.-Y.; Gao, X.-L. The Effect of Alternating Fragmentor Voltages of LC-MS in Full Scan Mode on Data Quality: A Comparative Study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2022**, *228*, 104625. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2022.104625>.
- (84) Pulsed Multiple Reaction Monitoring Approach to Enhancing Sensitivity of a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer | *Analytical Chemistry*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac103006b> (accessed 2025-07-30).
- (85) Rubino, F. M. Center-of-Mass Iso-Energetic Collision-Induced Decomposition in Tandem Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Molecules* **2020**, *25* (9), 2250. <https://doi.org/10.3390/molecules25092250>.
- (86) NERBRINK, O.; DAHLBÄCK, M. Basic Nebulizer Function. *Journal of Aerosol Medicine* **1994**, *7* (s1), S-7. https://doi.org/10.1089/jam.1994.7.Suppl_1.S-7.
- (87) Levitan, I. Evaluating Membrane Structure by Laurdan Imaging: Disruption of Lipid Packing by Oxidized Lipids. *Current topics in membranes* **2021**, *88*, 235. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2021.10.003>.
- (88) Bagatolli, L. A. LAURDAN Fluorescence Properties in Membranes: A Journey from the Fluorometer to the Microscope. In *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*; Mély, Y., Duportail, G., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 3–35. https://doi.org/10.1007/4243_2012_42.
- (89) Bunge, A.; Müller, P.; Stöckl, M.; Herrmann, A.; Huster, D. Characterization of the Ternary Mixture of Sphingomyelin, POPC, and Cholesterol: Support for an Inhomogeneous Lipid Distribution at High Temperatures. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (7), 2680. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112904>.
- (90) Noutsis, P.; Gratton, E.; Chaieb, S. Assessment of Membrane Fluidity Fluctuations during Cellular Development Reveals Time and Cell Type Specificity. *PLoS ONE* **2016**, *11* (6), e0158313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158313>.

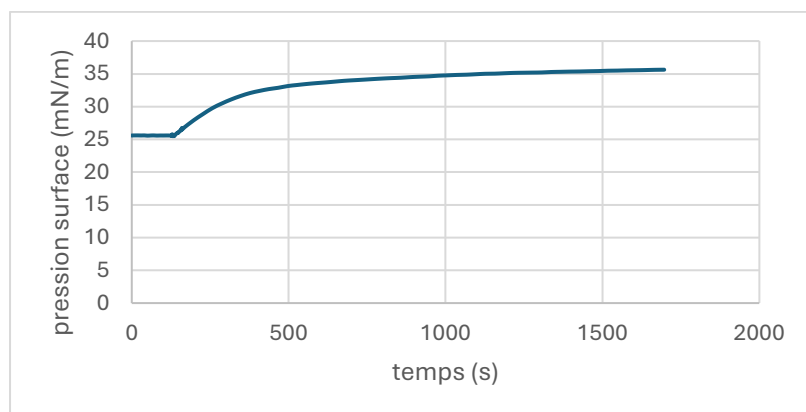
8. Annexes

Annexe 1. Données ayant servi à faire les calculs à 20 mN/m

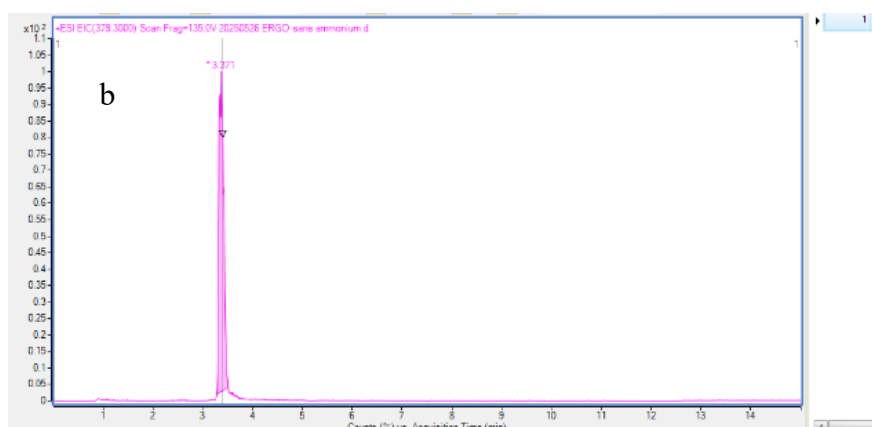
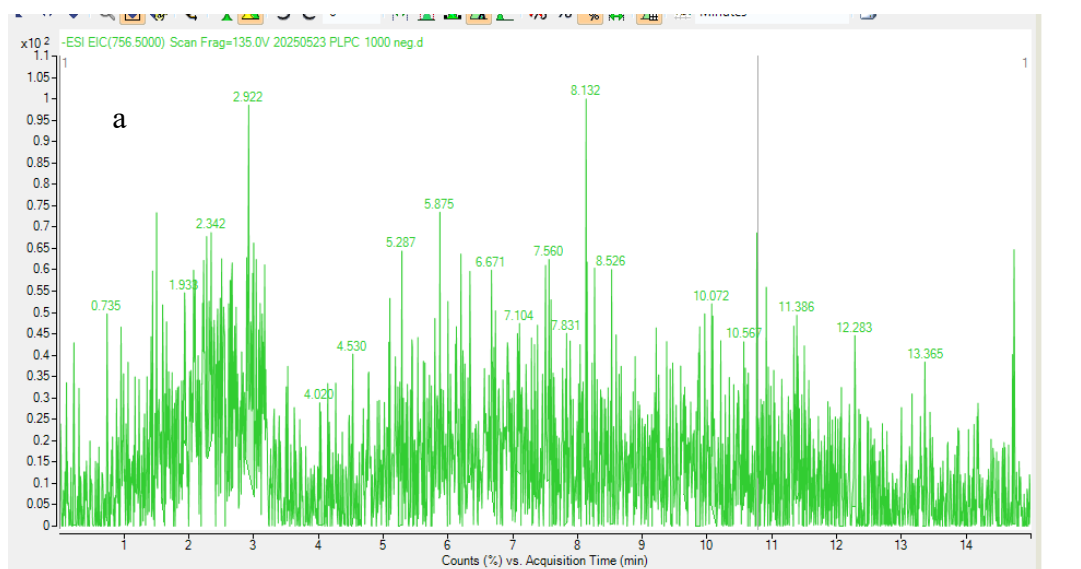
	A (\AA^2)	A_{th} (\AA^2)	ΔG_{id} $\times 10^{-23} \text{J/molécule}$	$\int_0^\pi A d\pi$ $\times 10^{-23} \text{J/molécule}$
SM	$66,5 \pm 2,1$			$1689,2 \pm 62,8$
POPC	$63,9 \pm 1,8$			$1687,3 \pm 4,6$
Chol	$36,3 \pm 0,4$			$816,3 \pm 28,2$
Sito	$46,4 \pm 0,4$			$1123,9 \pm 212,3$
POPC/SM/chol 1 :1 :1	$62,1 \pm 1,7$	55,5	-444,6	$1539,2 \pm 35,0$
POPC/SM/chol/sito 1 :1 :0,95 :0,05	$57,7 \pm 1,9$	55,7	-471,4	$1333,2 \pm 60,5$
POPC/SM/chol/sito 1 :1 :0,5 :0,5	$72,0 \pm 2,4$	57,3	-538,2	$1812,8 \pm 62,1$

Annexe 2. Aexc calculées à 32 mN/m pour les mélanges POPC/SM/chol 1 :1 :1 avec 0%, 5% et 50% de substitution du cholestérol par du β -sitostérol

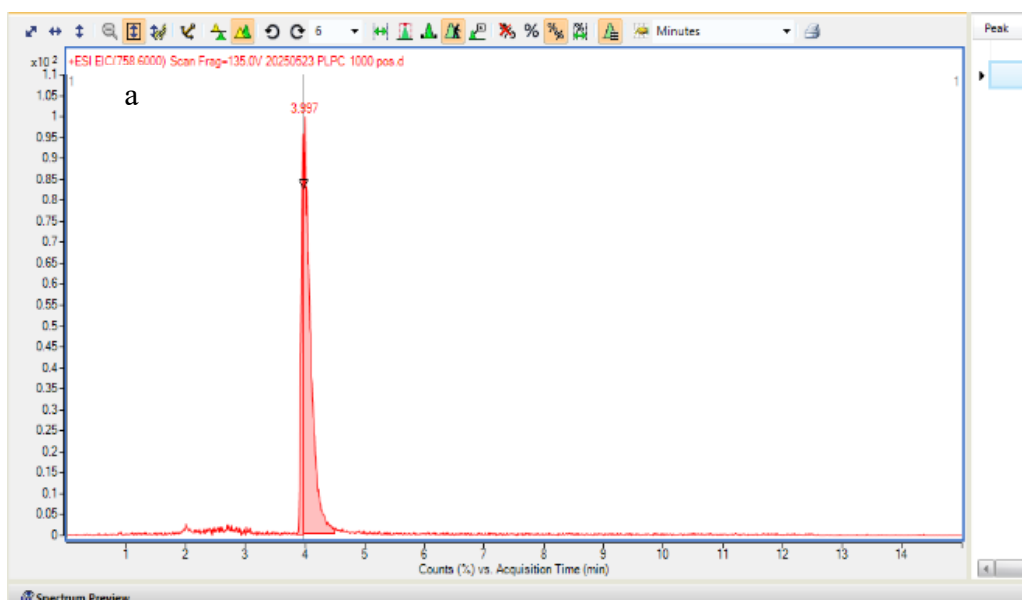
1:1:1 POPC/SM/chol (% de substitution)	Aexc à 32 mN/m (\AA^2)
0	6,5
5	2,4
50	12,7

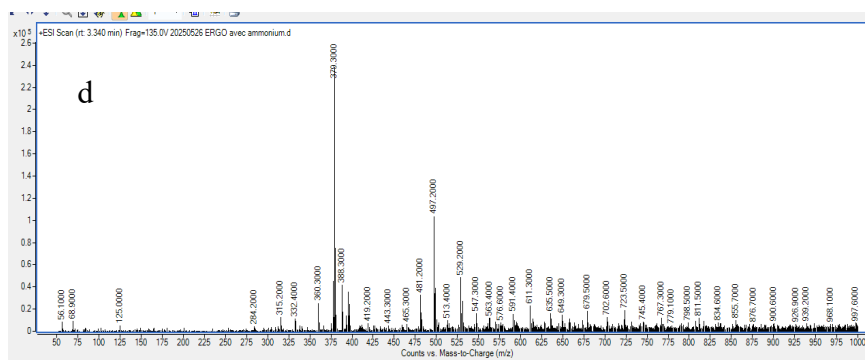
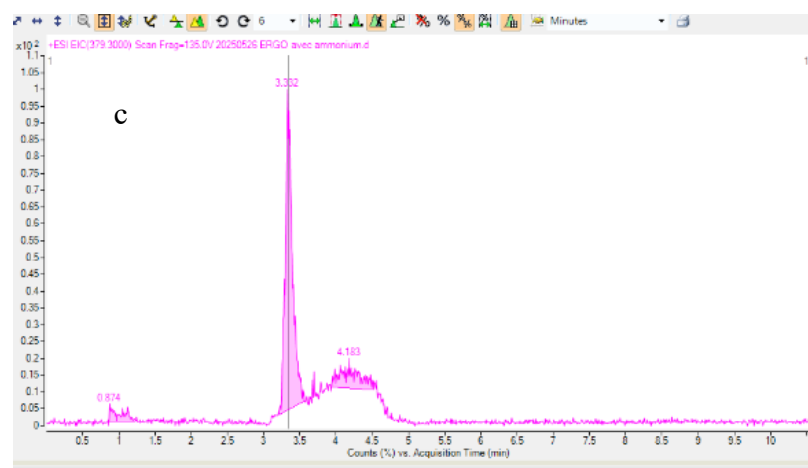
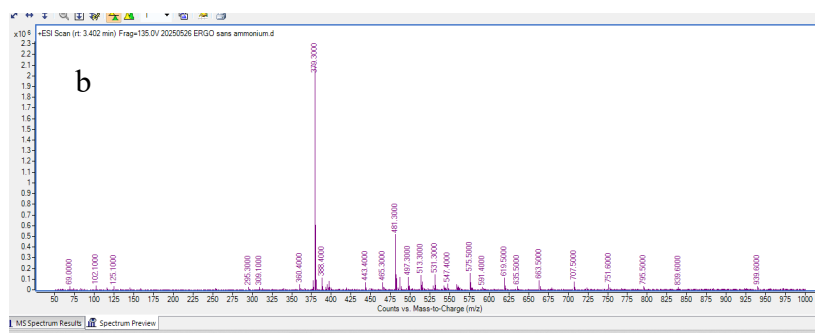


Annexe 3. Injection de surfactine en sous-phase au sein d'une monocouche PLPC/Sito/DPPC

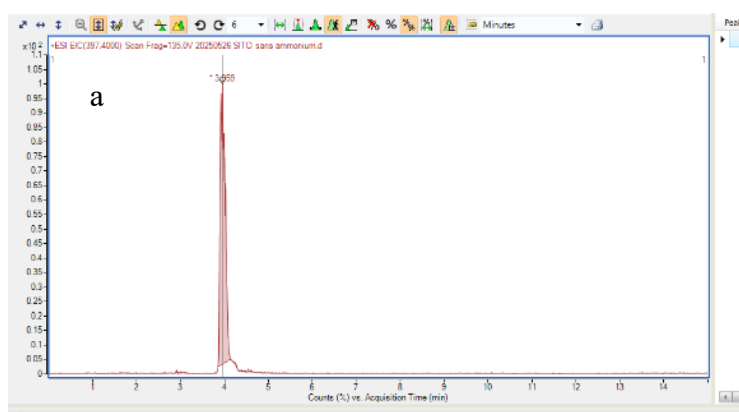


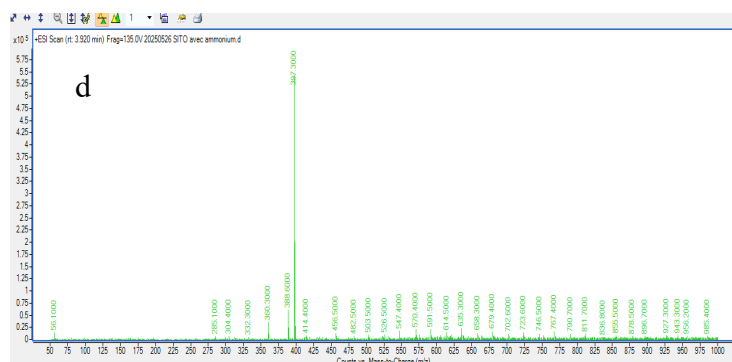
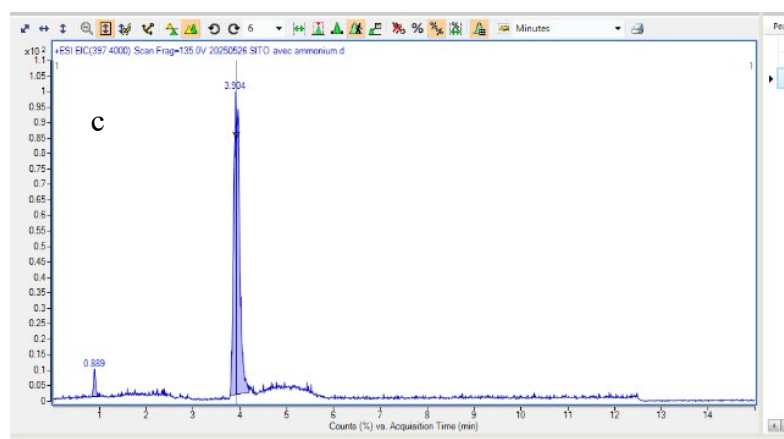
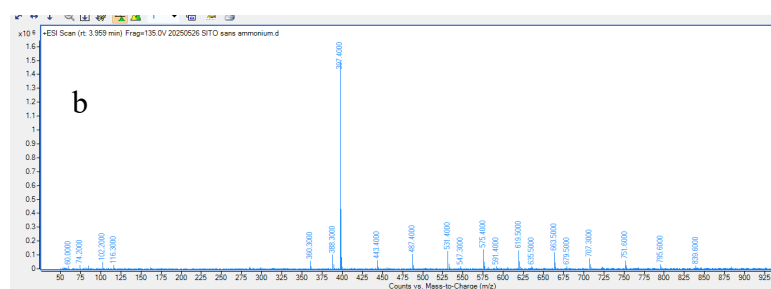
Annexe 4. Chromatogrammes du PLPC en mode scan a. EIC 756,5 ESI⁻ b. EIC 758,6 ESI⁺



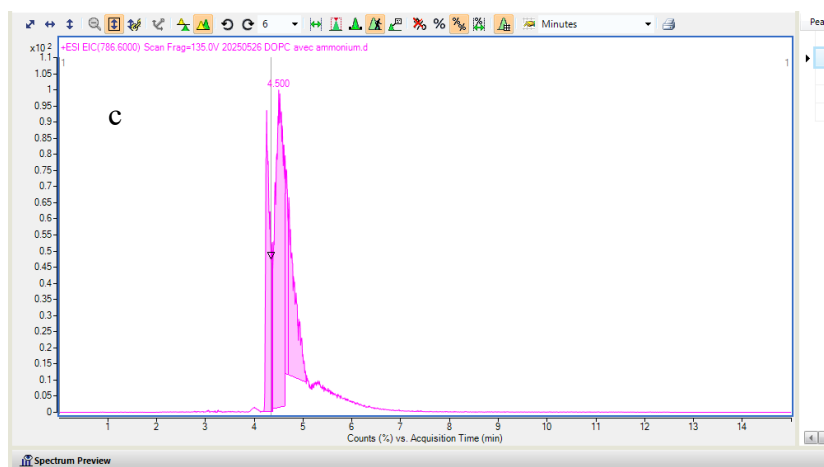
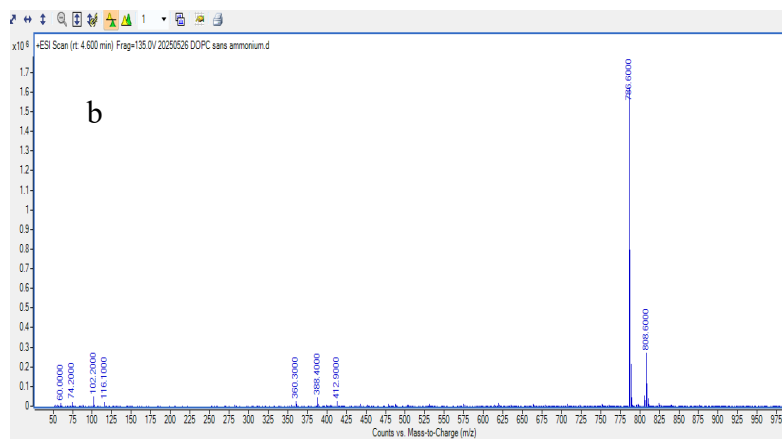
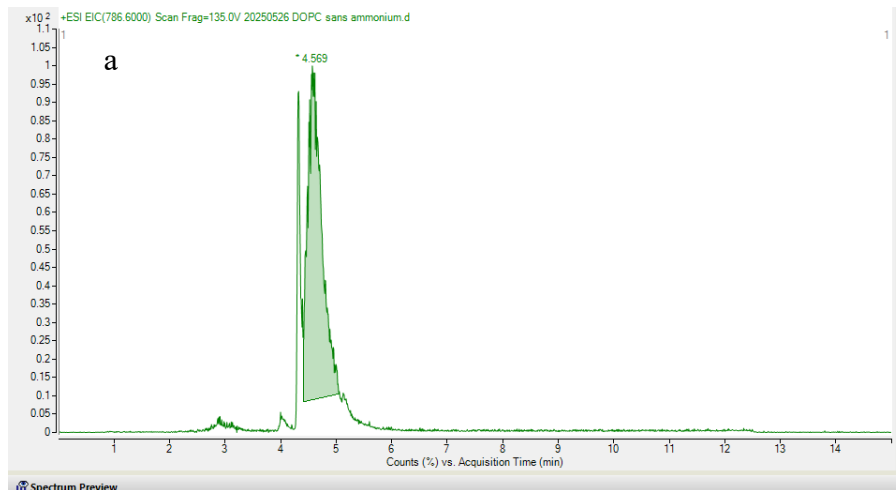


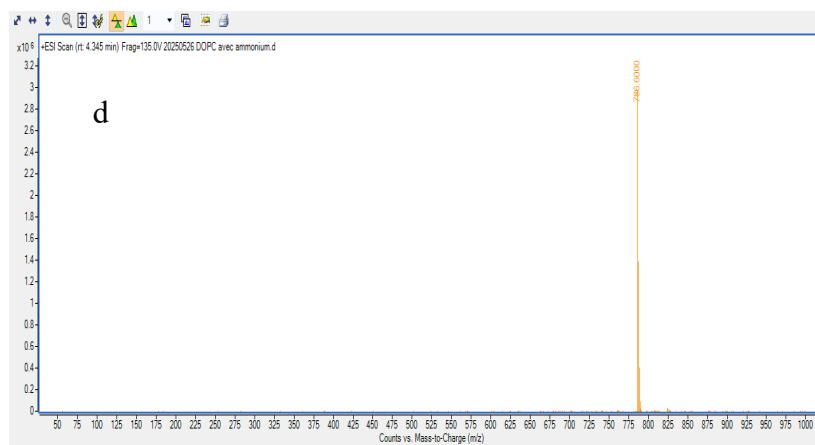
Annexe 5. chromatogrammes a. EIC 379,3 ergostérol sans formiate d'ammonium b. spectre de masse ergostérol sans formiate d'ammonium c. EIC 379,3 ergostérol avec formiate d'ammonium d. spectre de masse ergostérol avec formiate d'ammonium



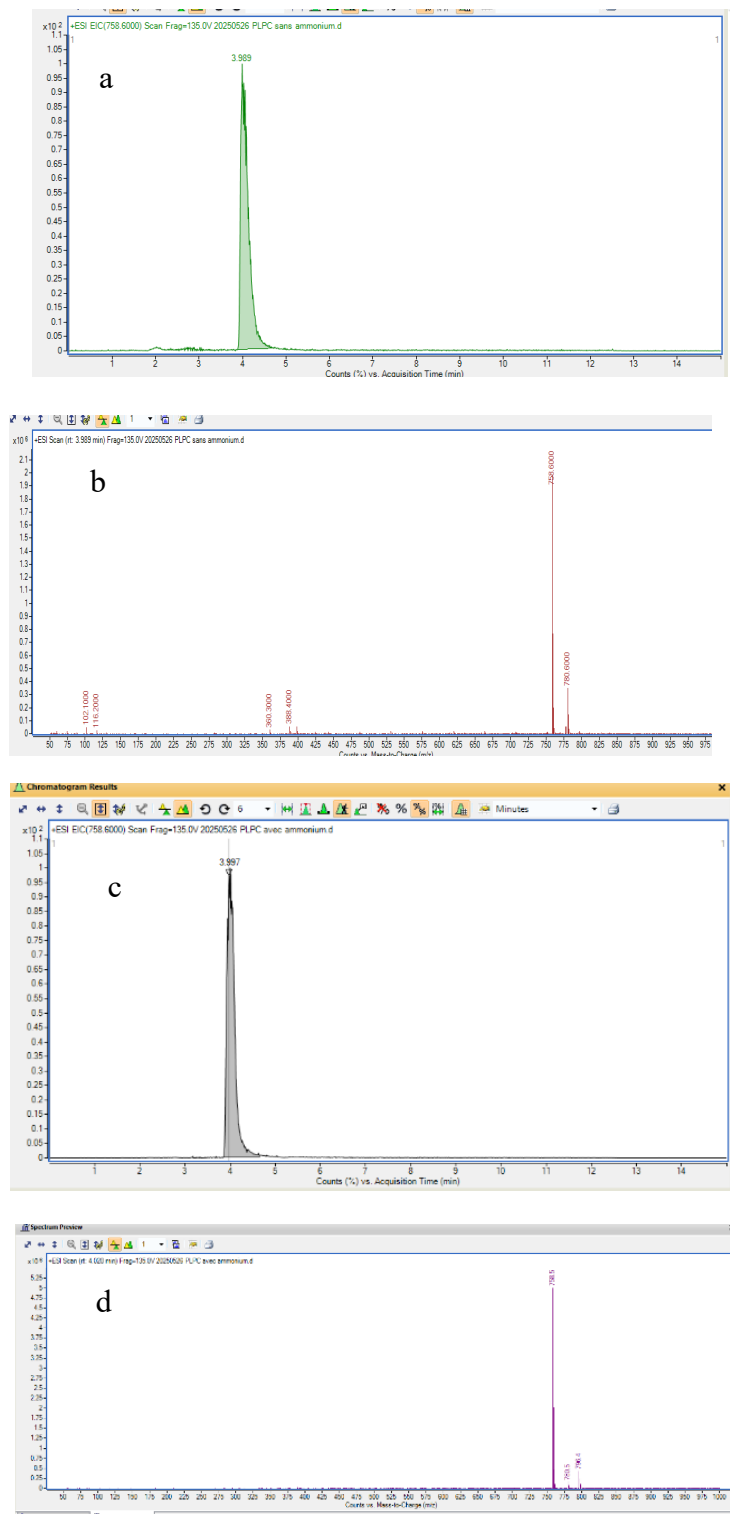


Annexe 6. chromatogrammes a. EIC 397,4 β -sitostérol sans formiate d'ammonium b. spectre de masse β -sitostérol sans formiate d'ammonium c. EIC β -sitostérol avec formiate d'ammonium d. spectre de masse β -sitostérol avec formiate d'ammonium

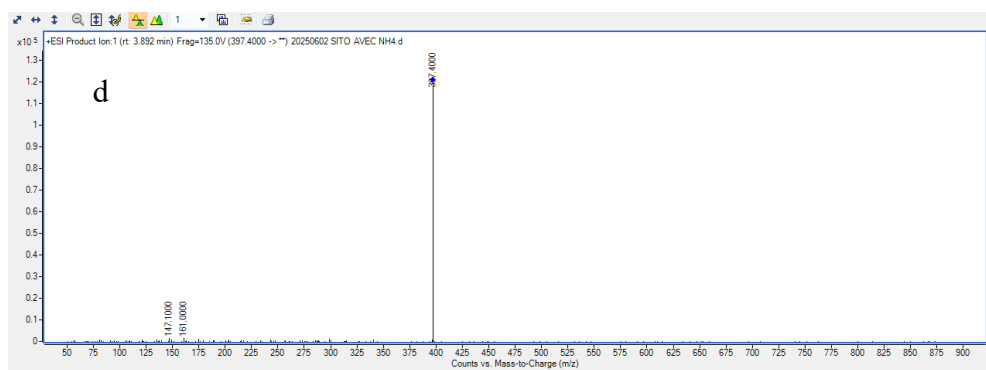
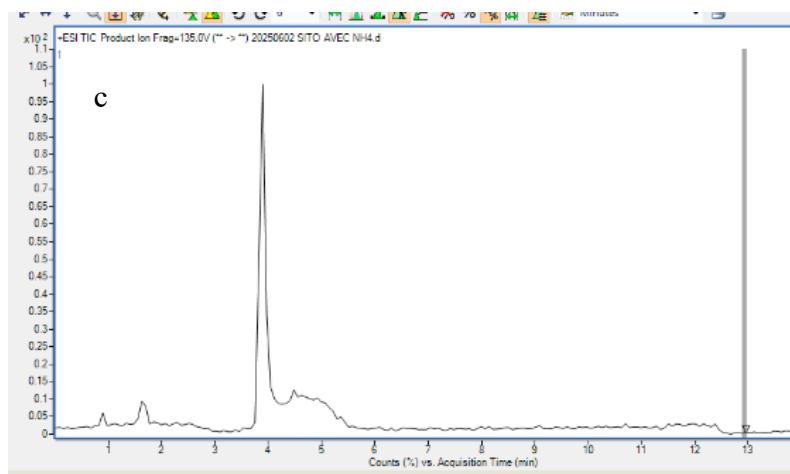
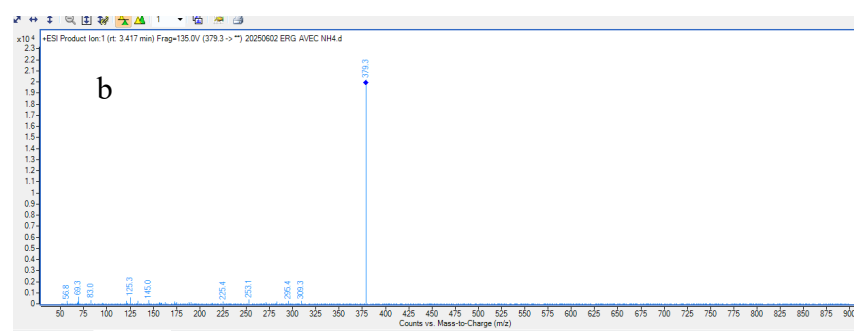
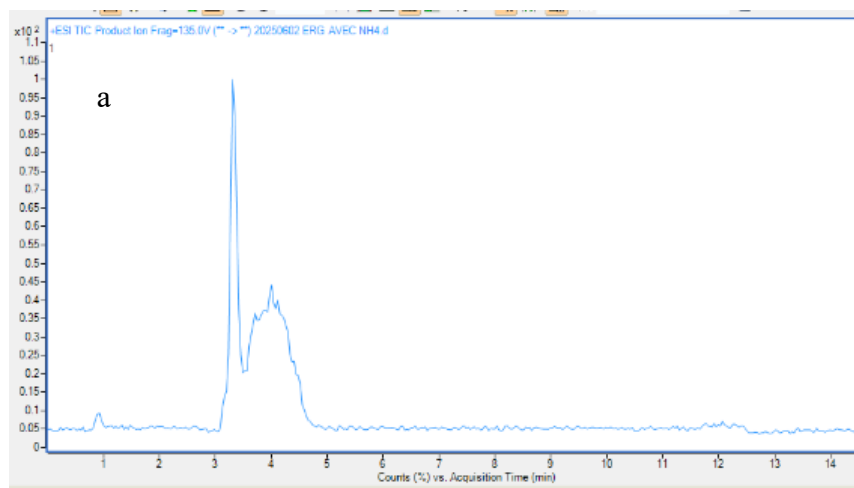




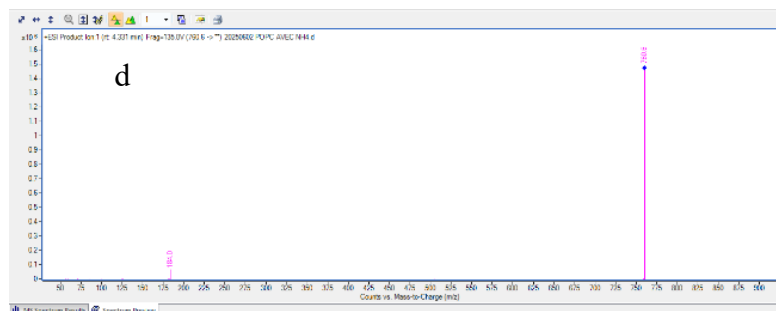
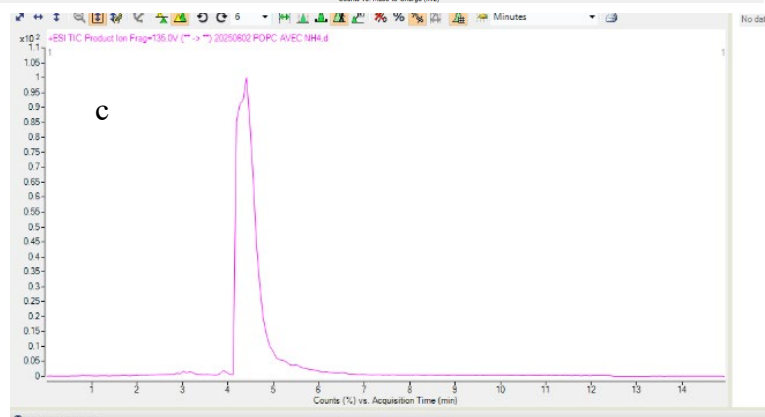
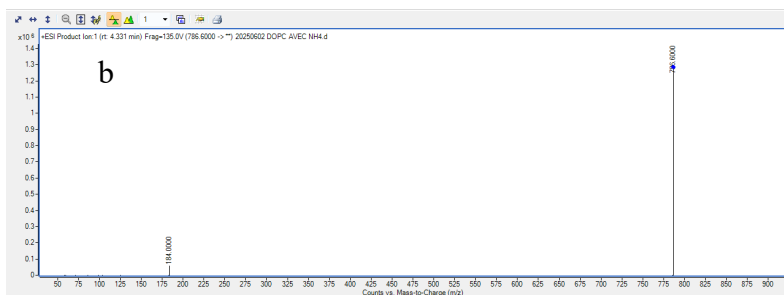
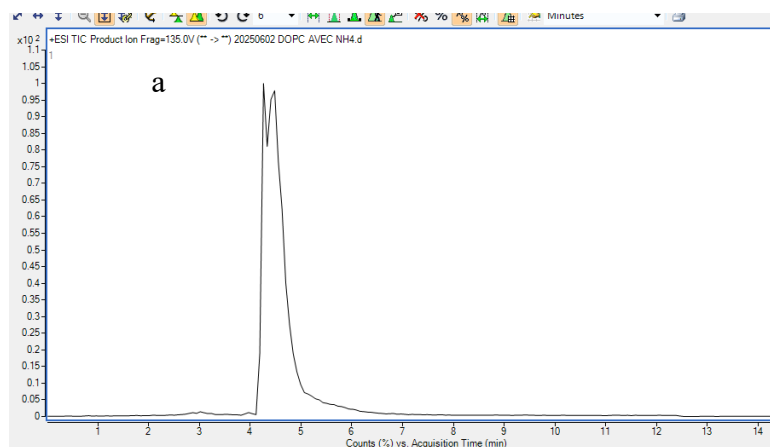
Annexe 7. Chromatogrammes a. EIC 786,6 DOPC sans formiate d'ammonium b. spectre de masse du DOPC sans formiate d'ammonium c. EIC 786,6 DOPC avec formiate d'ammonium d. spectre de masse du DOPC avec formiate d'ammonium

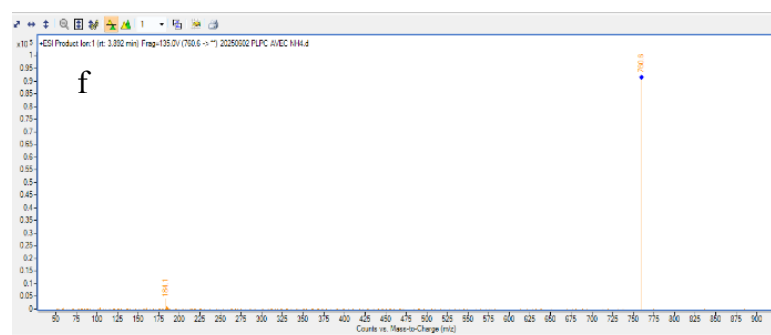
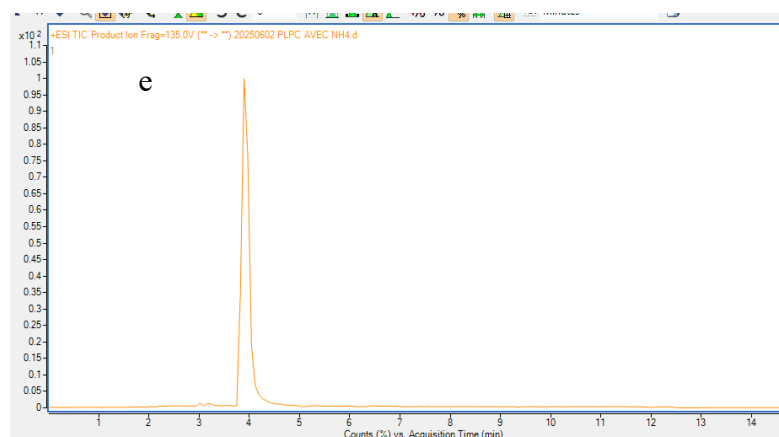


Annexe 8. d'ammonium i. EIC 758,6 PLPC sans formiate d'ammonium j. spectre de masse du PLPC avec formiate d'ammonium k. EIC 758,6 PLPC avec formiate d'ammonium l. spectre de masse du PLPC avec formiate d'ammonium

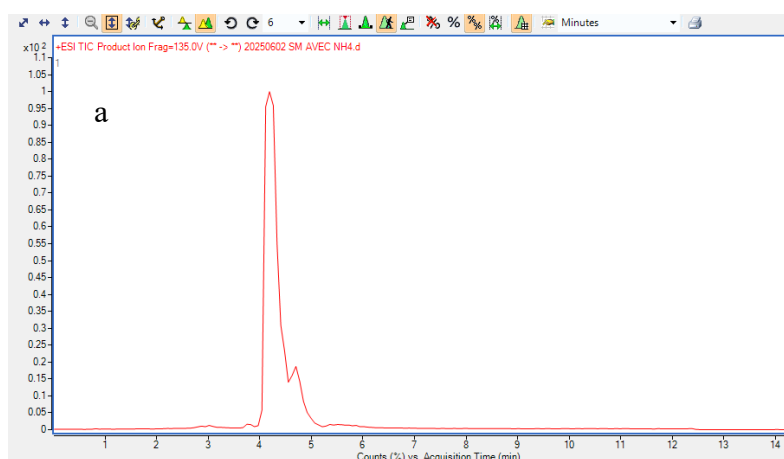


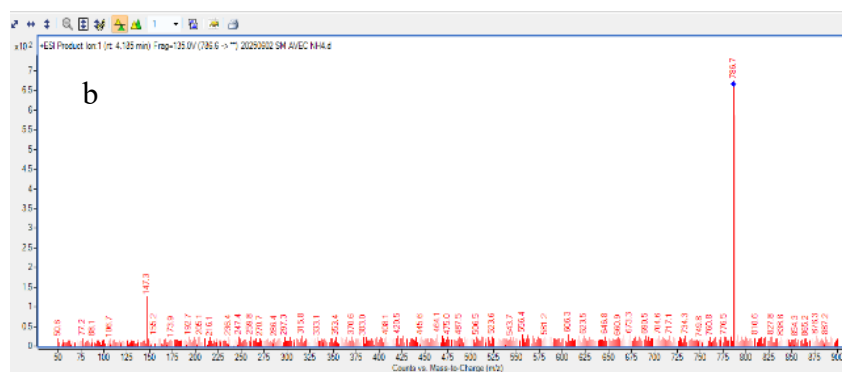
Annexe 9. Product ion a. TIC transition ergostérol b. spectre de masse de du product ion de l'ergostérol c. TIC transition β -sitostérol d. spectre de masse du product ion du β -sitostérol



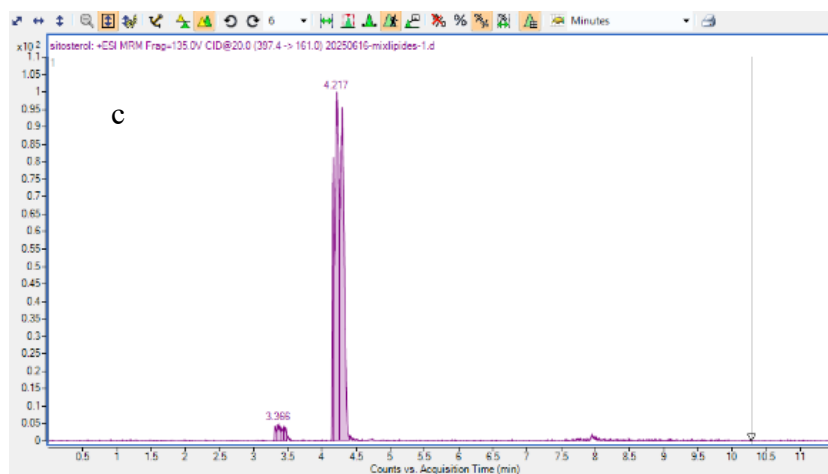
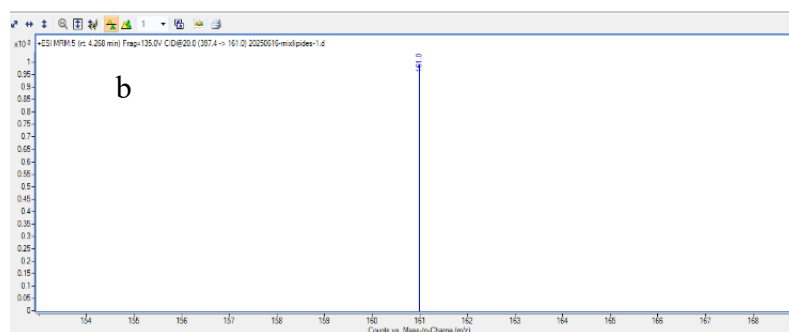
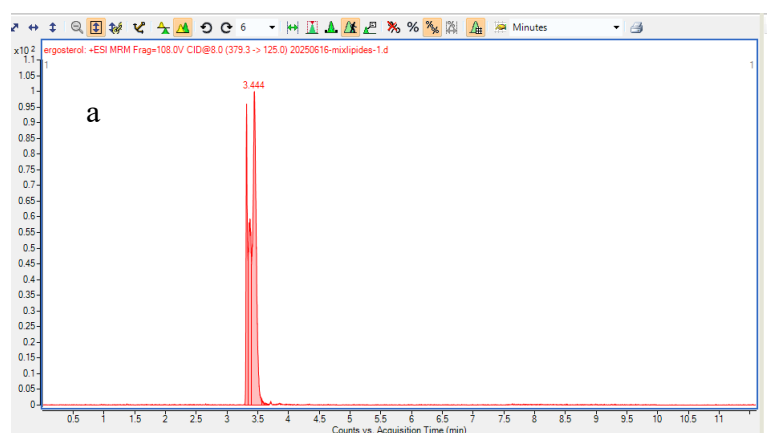


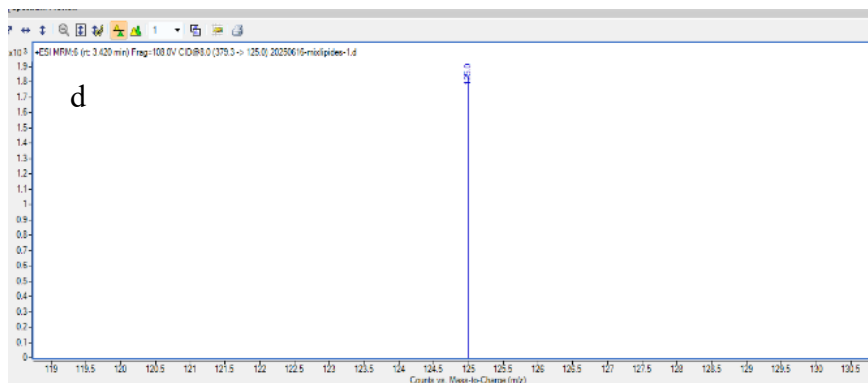
Annexe 10. Product ion a TIC transition DOPC b. spectre de masse du product ion du DOPC c. TIC transition POPC d. spectre de masse de du product ion du POPC e. TIC transition PLPC f. spectre de masse du product ion du PLPC



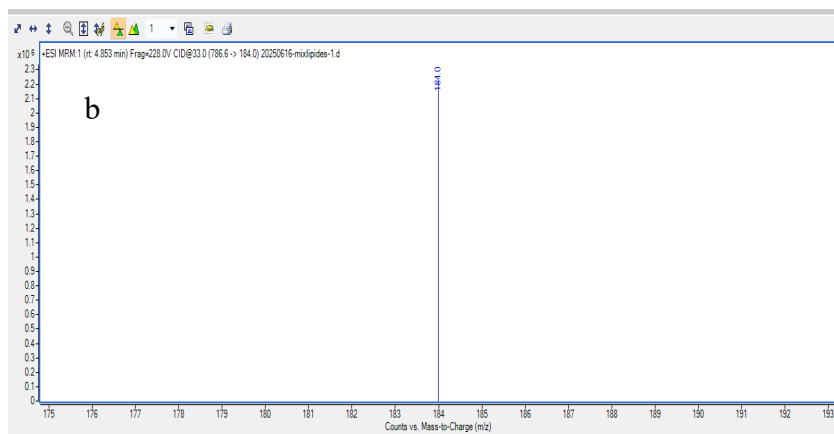
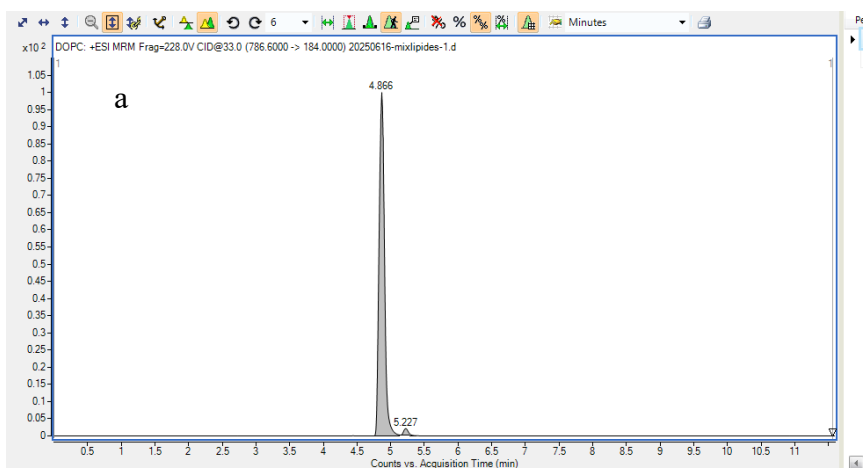


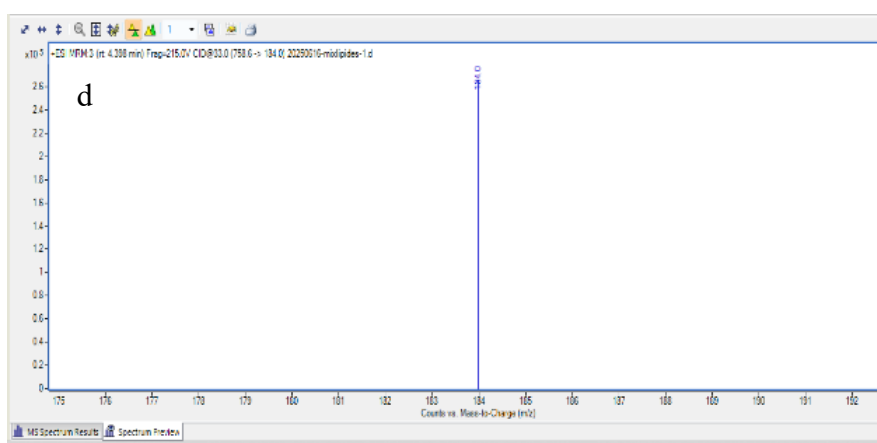
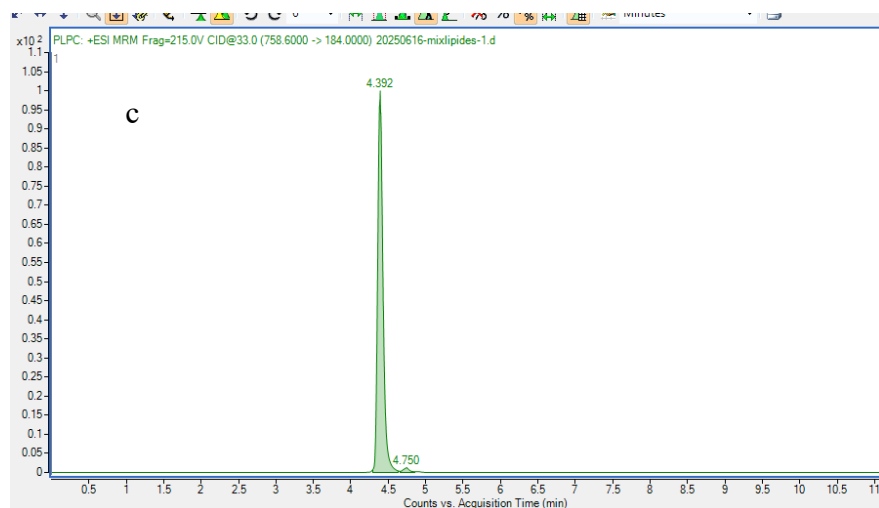
Annexe 11 . Product ion a TIC transition de la sphingomyéline b. spectre de masse du product ion de la sphingomyéline





Annexe 12 Analyse MRM a. de l'ergostérol b. spectre de masse de l'ergostérol c. β -sitostérol d. spectre de masse du β -sitostérol





Annexe 13 Analyse MRM a.DOPC b. spectre de masse du DOPC c. PLPC d. spectre de masse du PLPC

8.1 LEXIQUE

(D'après le Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine)

Angiogenèse

1) Ensemble des phénomènes qui concourent au développement du système vasculaire au cours de la vie embryonnaire et de la croissance, à partir de cellules endothéliales différenciées sous la dépendance de facteurs de croissance.

2) Processus désignant l'élaboration d'un néo-endothélium vasculaire à partir de l'endothélium des capillaires, lors de la cicatrisation ou de la croissance d'un tissu tumoral.

3) Processus pathologique, intervenant :

- dans la croissance des tumeurs malignes et l'apparition de métastases, à partir d'une certaine taille (1 à 2 mm), la tumeur pour survivre doit développer de nouveaux vaisseaux ;

- dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinopathie diabétique, les rétinopathies ischémiques secondaires aux thromboses veineuses ou aux vascularites et la rétinopathie des prématurés.

L'angiogenèse est régulée par un équilibre complexe entre des facteurs pro- et anti-angiogénique. Elle est contrôlée par différents activateurs et inhibiteurs produits par les cellules saines et tumorales.

Cellule cancéreuse

Une cellule cancéreuse est une cellule qui a acquis des mutations génétiques ou épigénétiques lui permettant de se diviser sans contrôle. Cette prolifération anarchique conduit à la formation de tumeurs. Les cellules cancéreuses peuvent également se détacher de la tumeur primaire et coloniser d'autres parties du corps, provoquant des métastases.

Epigénétique :

Théorie selon laquelle des facteurs cellulaires ou extérieurs peuvent intervenir dans le développement d'un organisme en modifiant l'expression d'un programme génétique. Actuellement ce terme correspond à « l'influence de l'environnement cellulaire et physiologique sur l'expression des gènes » (INSERM) mais aussi aux changements héréditaires du phénotype sans modification du génome. Ainsi est expliquée la multiplicité des phénotypes individuels comme chez les jumeaux homozygotes qui ont pourtant la même formule génique. Parmi les mécanismes en cause, on peut citer la méthylation de la molécule d'ADN et l'influence des protéines histones dans l'organisation spatiale du matériel génétique avec maintien de l'information au cours de la division cellulaire.

Génotype :

Ensemble de l'information transmise héréditairement et dépendant des gènes provenant des cellules parentales.

Métastase :

En cancérologie, colonie cellulaire implantée à distance d'une tumeur primitive, sans relation directe avec celle-ci et caractérisant la dissémination, le plus souvent par voie lymphatique, veineuse ou canalaire (bronche, canal biliaire), d'une tumeur maligne invasive. Sa présence fournit la preuve formelle du caractère malin d'une prolifération tumorale. Pour affirmer la nature métastatique d'une lésion qui se comporte par sa malignité comme la tumeur elle-même, sa structure histologique doit être similaire ou s'apparenter au cancer initial.

Mutation :

Une mutation est un changement permanent dans la séquence nucléotidique du génome de l'organisme.

Les mutations germinales et somatiques sont les deux types de mutations qui se produisent dans les cellules du corps d'organismes multicellulaires à différents stades de la vie.

Une mutation de la lignée germinale est un changement héréditaire de l'ADN d'une cellule germinale. La progéniture hérite des mutations de la lignée germinale, car il s'agit d'un changement dans la séquence de l'ADN des cellules sexuelles.

Une mutation somatique est une mutation acquise, qui se produit dans une seule cellule du corps d'un individu après sa conception. Les mutations somatiques ne sont transmises qu'aux cellules descendantes de la cellule mutée.

Phénotype :

Ensemble des caractères observables d'une cellule, d'un organisme ou d'un individu qui est conditionné en grande partie par l'expression de son génotype mais qui dépend aussi des influences du milieu ou des caractères acquis au cours du développement de l'individu.

Tumeur :

Masse cellulaire ou tissulaire néoformée, en excès par rapport au tissu hôte, et dont les cellules prolifèrent et persistent de façon indéfinie et autonome.

Une tumeur peut se développer aux dépens soit des tissus épithéliaux, soit des tissus mésenchymateux, soit exceptionnellement des deux. On distingue :

1) la tumeur bénigne, plus ou moins encapsulée, dont l'accroissement est exclusivement local, qui refoule les tissus environnants sans les envahir, ne donne pas de métastase et ne récidive pas après exérèse complète ;

2) la tumeur maligne ou cancer, dont l'accroissement est infiltrant et destructeur, qui peut s'accompagner d'une propagation à distance du site primitif constituant la tumeur secondaire ou métastase, avec risque de récidive après exérèse, et dont l'évolution spontanée est mortelle.

8.2 Contribution personnelle

Dans un premier temps, j'ai effectué une recherche bibliographique approfondie portant sur le rôle du cholestérol au sein des radeaux lipidiques, son implication dans l'homéostasie en contexte cancéreux ainsi que son influence sur les voies de signalisation cellulaires.

Parallèlement, j'ai également mené une revue de la littérature concernant l'effet du bêta-sitostérol sur les cellules cancéreuses.

Sur le plan expérimental, j'ai réalisé des expériences à l'aide de la balance à film de Langmuir, en mode adsorption et compression, ainsi que des mesures de fluorescence au Laurdan. Avec le soutien de Manon Genva, j'ai contribué à la mise au point d'une méthode UHPLC-MS/MS à triple quadrupôle permettant l'identification des lipides.

Enfin, j'ai rédigé l'ensemble de ce travail et l'ai corrigé en tenant compte des remarques de ma promotrice, Magali Deleu.

L'ensemble de ce mémoire constitue le résultat de mon travail personnel.